

Philipps



Universität  
Marburg

Philipps-Universität Marburg  
Fachbereich Biologie  
- Genetik -

**Genetische und biochemische Charakterisierung der  
Itaconsäure-Biosynthese in *Ustilago maydis***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sandra Kathrin Przybilla**

aus Gummersbach

Marburg/Lahn 2014

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 29.09.2014

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Johann Heider

Tag der mündlichen Prüfung am: 02.10.2014

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden von September 2011 bis Juni 2014 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Geiser, E.\*, Przybilla, S.\*, Friedrich, A., Buckel, W., Wierckx, N., Blank, L.M. and Bölker, M.  
A novel pathway for microbial itaconic acid production (in Vorbereitung)

(\*zu gleichen Teilen beigetragen)

weitere Veröffentlichungen:

Patent-Anmeldung - eingereicht am 21.03.2014 in Luxemburg - Anmeldenummer: LU92409

Titel: Means and methods for itaconic acid production

Bölker, M., Buckel, W., Przybilla S., Blank L.M., Wierckx, N.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Itaconsäure - ein Sekundärmetabolit mit großem Potential . . . . .	3
1.1.1 Sekundärmetabolismus . . . . .	3
1.1.2 Der Sekundärmetabolit Itaconsäure als <i>bio-based chemical building block</i> .	5
1.1.3 Itaconsäurebiosynthese in <i>Aspergillus terreus</i> . . . . .	6
1.2 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus . . . . .	8
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> . . . . .	8
1.2.2 Sekundärmetabolismus in <i>U. maydis</i> . . . . .	9
1.3 Zielsetzung . . . . .	11
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>12</b>
2.1 Biochemische Charakterisierung des Itaconsäure-Genclusters in <i>U. maydis</i> . . . .	12
2.1.1 Ein Protein der PrpF-Superfamilie ist essentiell für die Itaconsäure-Biosynthese von <i>U. maydis</i> . . . . .	12
2.1.2 Charakterisierung des potenziellen Itaconsäure-Genclusters . . . . .	13
2.1.3 Der Transkriptionsfaktor Um05080 reguliert spezifisch die Expression der Itaconsäure-Biosynthesegene . . . . .	16
2.1.4 Lokalisierung der an der Itaconsäure-Biosynthese beteiligten Proteine . .	18
2.1.5 Expression des Itaconsäure-Genclusters aus <i>U. maydis</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	20
2.1.6 Das Gen <i>um05076</i> kodiert für eine <i>trans</i> -Aconitat-Decarboxylase . . . . .	21
2.1.7 Das Gen <i>um11778</i> kodiert für eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase und katalysiert den ersten Schritt der Itaconsäure-Biosynthese in <i>U. maydis</i> . . . . .	22
2.1.8 <i>In vitro</i> Itaconsäure-Biosynthese durch Adi1 und Tad1 . . . . .	23
2.1.9 Die Überexpression von Ctp1 und Ria1 führt zu einer erhöhten Itaconsäure-Produktion . . . . .	23
2.1.10 Modell des Itaconsäure-Biosyntheseweges in <i>U. maydis</i> . . . . .	24
2.2 Charakterisierung einer weiteren Aconitat- $\Delta$ -Isomerase . . . . .	26
2.2.1 Adi2 hat eine hohe Ähnlichkeit zu Adi1 und ist in einem potentiellen Gencluster organisiert . . . . .	26
2.2.2 Die Überexpression von <i>adi2</i> kann den Phänotyp von $\Delta$ <i>adi1</i> retten . . .	26
2.2.3 Adi2 ist eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase . . . . .	27



2.2.4	Der Adi2-Gencluster wird für die Verstoffwechselung von <i>cis</i> -und <i>trans</i> -Aconitat benötigt . . . . .	28
2.2.5	Die Überexpression des Transkriptionsfaktors führt zu einem reduzierten Wachstum auf <i>cis</i> -Aconitat . . . . .	30
2.2.6	Der potentielle Adi2-Gencluster ist für die pathogene Entwicklung von <i>U. maydis</i> nicht essentiell . . . . .	32
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
3.1	Biochemische Charakterisierung des Itaconsäure-Biosyntheseweges in <i>U. maydis</i> .	34
3.1.1	Die Itaconat-Synthese in <i>U. maydis</i> erfolgt in zwei Schritten . . . . .	34
3.1.2	Die Gene für die Itaconsäure Biosynthese sind in einem Gencluster organisiert . . . . .	36
3.1.3	Die Überexpression von Cyp3 führt zu einer Reduktion der Itaconsäure-Produktion . . . . .	38
3.2	Charakterisierung des Adi2-Genclusters . . . . .	40
3.2.1	Der Adi2-Gencluster ist für die Verstoffwechselung von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Aconitat essentiell . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>42</b>
4.1	Bakterien- und Hefestämme . . . . .	42
4.1.1	<i>E.coli</i> -Stämme . . . . .	42
4.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme . . . . .	42
4.1.3	<i>Ustilago maydis</i> -Stämme . . . . .	42
4.2	Plasmide und Primer . . . . .	43
4.2.1	Standard-Plasmide . . . . .	43
4.3	In dieser Arbeit erstellte Stämme . . . . .	43
4.3.1	<i>Ustilago maydis</i> -Stämme . . . . .	43
4.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme . . . . .	44
4.3.3	Plasmide für die Transformation von <i>U. maydis</i> . . . . .	45
4.3.4	Allgemeine Materialien . . . . .	58
4.3.5	Kits . . . . .	58
4.3.6	Chemikalien . . . . .	58
4.3.7	Enzyme . . . . .	61
4.4	Puffer und Lösungen (Angaben für jeweils 1 Liter) . . . . .	62
4.4.1	Antibiotika . . . . .	62
4.4.2	Lösungen für die Plasmidpräparation mittels "kochender Lyse" . . . . .	62
4.4.3	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	62
4.4.4	Southern Blot-Puffer . . . . .	63
4.4.5	Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot . . . . .	63
4.4.6	Lösungen für die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen . . . . .	64
4.4.7	Präparation chromosomaler DNA von <i>U. maydis</i> . . . . .	65
4.4.8	Lösungen für die Protoplasierung und Transformation von <i>U. maydis</i> . .	65

## Inhaltsverzeichnis

4.4.9	Puffer für die Aufreinigung von Proteinen . . . . .	65
4.4.10	Lösungen zur Herstellung kompetenter Hefezellen . . . . .	66
4.4.11	Lösungen zur Herstellung von modifiziertem Tabuchi-Medium (Verduyn et al., 1992) . . . . .	67
4.5	Mikrobiologische Nährmedien . . . . .	68
4.5.1	Nährmedien für die Kultivierung von <i>U. maydis</i> . . . . .	68
4.5.2	Nährmedien für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	70
4.5.3	Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .	71
4.6	Kultivierung von Mikroorganismen . . . . .	72
4.6.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	72
4.6.2	Kultivierung von <i>U. maydis</i> . . . . .	72
4.6.3	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	73
4.7	Molekularbiologische Techniken . . . . .	73
4.7.1	Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	73
4.7.2	Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren . . . . .	74
4.7.3	PCR-Techniken . . . . .	76
4.7.4	Transformation von Mikroorganismen . . . . .	78
4.7.5	Genetische Modifikation von <i>U. maydis</i> . . . . .	79
4.7.6	Integration von Vektoren in den genomischen <i>ip</i> -Locus . . . . .	81
4.8	Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen . . . . .	81
4.8.1	Produktion von rekombinanten Proteinen . . . . .	81
4.8.2	Aufreinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> . . . . .	82
4.9	Analyse von Proteinen . . . . .	82
4.9.1	Proteinextraktion aus <i>U. maydis</i> . . . . .	82
4.9.2	Konzentrationsbestimmung . . . . .	82
4.9.3	SDS-Gelelektrophorese . . . . .	83
4.9.4	Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot) . . . . .	83
4.9.5	Gesamtproteinnachweis durch Anfärben des SDS-Geles . . . . .	84
4.9.6	Analyse der enzymatischen Aktivität von Proteinen . . . . .	84
4.10	Zellbiologische Untersuchung von <i>U. maydis</i> . . . . .	84
4.10.1	Infektion von <i>Zea mays</i> . . . . .	84
4.10.2	Test auf filamentöses Wachstum auf PD-Aktivkohle-Medium . . . . .	85
4.10.3	Mikroskopie von <i>U. maydis</i> -Zellen . . . . .	85
4.10.4	Zellwandfärbung . . . . .	86
4.11	Biochemische Methoden . . . . .	86
4.11.1	Analyse der Itaconsäure-Produktion durch <i>High-Pressure-Liquid-Chromatography</i> (HPLC) . . . . .	86
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Regulatorisches Netzwerk von Sekundärmetabolit-Genclustern. . . . .	4
1.2	Rolle der Itaconsäure in der Synthese von wirtschaftlich interessanten chemischen Verbindungen. . . . .	5
1.3	Der Itaconsäure-Biosyntheseweg in <i>A. terreus</i> . . . . .	6
1.4	Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> . . . . .	8
1.5	Übersicht der von <i>U. maydis</i> produzierten Sekundärmetabolite. . . . .	10
2.1	Übersicht der Itaconsäure-Produktion der PrpF-Deletionsmutanten in <i>U. maydis</i> . . . . .	13
2.2	Übersicht der Itaconsäure-Produktion der einzelnen Deletionsmutanten des potentiellen Itaconsäure-Genclusters in <i>U. maydis</i> . . . . .	15
2.3	Transkriptlevel der Gene des Itaconsäure-Genclusters unter Itaconat-Produktionsbedingungen im Wildtyp und in der <i>ria1</i> -Deletionsmutante . . . . .	16
2.4	Einfluss des Transkriptionsfaktors Ria1 auf die Transkriptlevel der Gene des potentiellen Itaconsäure-Genclusters . . . . .	17
2.5	Intrazelluläre Lokalisierung der an der Itaconsäure-Biosynthese beteiligten Proteine in <i>U. maydis</i> . . . . .	19
2.6	Expression der <i>U. maydis</i> Itaconsäure-Biosynthese Enzyme in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	20
2.7	Katalytische Aktivität von Um05076 (Tad1). . . . .	21
2.8	Katalytische Aktivität von Um11778 (Adi1). . . . .	22
2.9	Itaconsäure-Biosynthese durch Adi1 und Tad1 <i>in vitro</i> . . . . .	23
2.10	Überexpressions-Analyse der einzelnen Gene des Itaconsäure-Genclusters. . . . .	24
2.11	Modell des Itaconsäure-Biosyntheseweges in <i>U. maydis</i> . . . . .	25
2.12	Der potentielle Adi2-Gencluster . . . . .	26
2.13	Vergleich der Aminosäuresequenz von Adi1 (Um11778) und Adi2 (Um02807) . . . . .	27
2.14	Um02807 kann Adi1 funktionell ersetzen . . . . .	28
2.15	Adi2 ist eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase . . . . .	29
2.16	Die Gene des Adi2-Genclusters werden für das Wachstum auf <i>cis</i> -und <i>trans</i> -Aconitat benötigt . . . . .	30
2.17	Die Überexpression des Transkriptionsfaktors führt zu einem reduzierten Wachstum auf <i>cis</i> -Aconitat . . . . .	31
2.18	Der Adi2-Gencluster hat keine essentielle Funktion während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i> . . . . .	32
3.1	Hypothetischer Reaktionsmechanismus von Adi1 . . . . .	34
3.2	Hypothetischer Reaktionsmechanismus von Tad1 . . . . .	35

## Abbildungsverzeichnis

3.3	Vergleich der Itaconsäure-Gencluster aus <i>A. terreus</i> , <i>U. maydis</i> und <i>P. hubeiensis</i> .	37
3.4	Hypothetischer Syntheseweg von Itaconat zu Itatartarat (ITT) in <i>Ustilago cynodontis</i> . . . . .	38
3.5	Die Überexpression von <i>cyp3</i> führt zur Produktion einer noch unbekannten Substanz . . . . .	39
4.1	Genetische Modifikationen von <i>U. maydis</i> . . . . .	80

# Zusammenfassung

Die ungesättigte Dicarbonsäure Itaconsäure wird durch mikrobielle Fermentation erzeugt und dient als Ausgangsstoff für die Produktion von Kosmetika, Klebstoffen oder sogar Biokraftstoff. Der phytopathogene Basidiomycet *Ustilago maydis* produziert unter bestimmten Bedingungen eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten, zu denen auch die Itaconsäure gehört. Der Biosyntheseweg der Itaconsäure war jedoch in diesem Pilz bisher noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden die für die Itaconsäure-Biosynthese in *U. maydis* verantwortlichen Gene identifiziert und charakterisiert. Alle beteiligten Gene sind in einem Gencluster organisiert, der durch den Transkriptionsfaktor Rial spezifisch reguliert wird. Anhand von Deletionsanalysen der entsprechenden Gene konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* zwei Enzyme essentiell für die Synthese von Itaconat sind. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die enzymatische Aktivität dieser Enzyme bestimmt. Dabei wurde gezeigt, dass das PrpF-ähnliche Protein Aconitat- $\Delta$ -Isomerase (Adi1) die Umwandlung von *cis*- zu *trans*-Aconitat und damit den ersten Schritt der Itaconsäure-Biosynthese in *U. maydis* katalysiert. Der zweite Schritt wird durch das zweite essentielle Enzym *trans*-Aconitat-Decarboxylase (Tad1) katalysiert, das die Decarboxylierung von *trans*-Aconitat zu Itaconat vermittelt. Basierend auf diesen Daten konnte ein Modell für den Itaconsäure-Biosyntheseweg in *U. maydis* aufgestellt werden. Es wird angenommen, dass *cis*-Aconitat durch den mitochondriellen Transporter Ctp1 vom Mitochondrium ins Cytosol exportiert wird. Dort dient es als Substrat für Adi1, das die Isomerisierung zu *trans*-Aconitat katalysiert. *Trans*-Aconitat wird anschließend durch Tad1 zu Itaconat decarboxyliert, das vermutlich durch den Plasmamembran-Transporter Itp1 aus der Zelle transportiert wird.

Der Itaconsäure-Gencluster ist während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* stark exprimiert. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Produktion von Itaconsäure während der biotrophen Phase nicht essentiell ist. Damit bleibt die biologische Rolle der Itaconsäure-Produktion für *U. maydis* weiterhin unklar.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde noch ein zweiter Gencluster in *U. maydis* identifiziert, der Ähnlichkeiten zum Itaconat-Gencluster aufweist. Dieser Gencluster enthält ein Gen für eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase (*adi2*), die in der Lage ist, die Funktion von Adi1 vollständig zu ersetzen. Durch Wachstumstests konnte gezeigt werden, dass der Adi2-Gencluster für die Verstoffwechselung von *cis*- und *trans*-Aconitat essentiell ist, das sich auch in der Wirtspflanze *Zea mays* findet. Die Fähigkeit, *trans*-Aconitat als Kohlenstoffquelle zu verwenden, ist für *U. maydis* während der pathogenen Entwicklung möglicherweise von Vorteil, es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Fähigkeit nicht essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist.

# 1 Einleitung

## 1.1 Itaconsäure - ein Sekundärmetabolit mit großem Potential

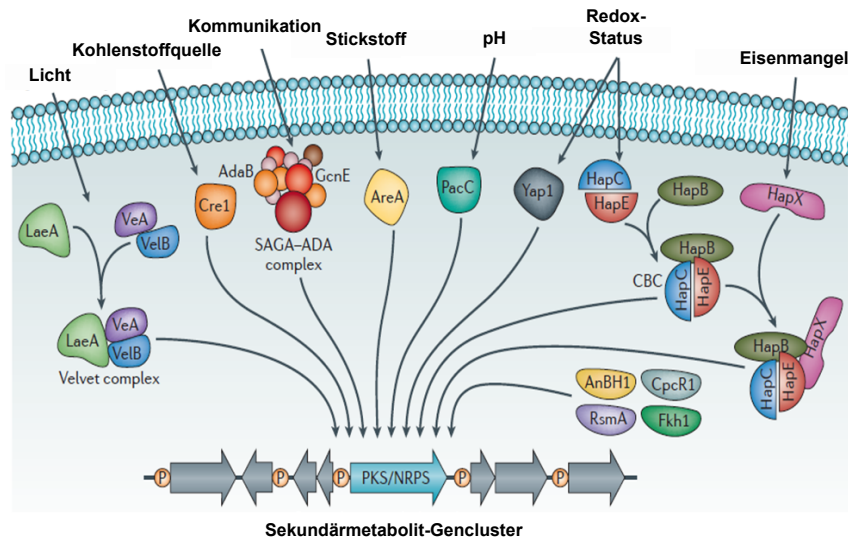
### 1.1.1 Sekundärmetabolismus

Sekundärmetabolite sind strukturell variable Stoffe mit geringem Molekulargewicht, die im Gegensatz zu Primärmetaboliten, nicht essentiell sind. Trotzdem kann die Produktion von Sekundärmetaboliten für den Organismus einen großen Vorteil darstellen, da diese zumeist bioaktiv sind und z.B. als Antibiotikum oder als chemisches Signal zur Kommunikation dienen (Yim et al., 2007). Die Synthese solcher Moleküle ist dabei oft taxonomisch begrenzt, das heißt nur eine kleine Gruppe von Organismen produziert den jeweiligen Sekundärmetaboliten.

Sekundärmetabolite werden häufig als Familie von verwandten Stoffen zu bestimmten Zeiten des Lebenszyklus produziert, da sie dem produzierenden Organismus dort einen spezifischen Vorteil verschaffen. Dabei ist die chemische Komplexität und Diversität der Sekundärmetabolite sehr hoch.

Die meisten Sekundärmetabolite können anhand der Enzyme, die an ihrer Biosynthese beteiligt sind, in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Keller et al., 2005). Die Polyketide stellen dabei die am häufigsten vorkommenden pilzlichen Sekundärmetabolite dar. Zu diesen gehört unter anderem das Toxin Aflatoxin B1 aus *Aspergillus flavus* (Nesbitt et al., 1962) und das Cholesterol-senkende Lovastatin aus *Aspergillus terreus* (Moore et al., 1985; Yoshizawa et al., 1994). Polyketide werden von Polyketid-Synthasen (PKS) synthetisiert, die mit eukaryotischen Fettsäure-Synthasen verwandt sind (Kennedy, 1999). Eine weitere Klasse sind die von Peptiden abgeleiteten Sekundärmetabolite, die durch nicht-ribosomale Peptid-Synthasen (NRPS) synthetisiert werden (Walsh, 2008). Dazu gehört auch das Antibiotikum Penicillin aus *Penicillium chrysogenum* (Smith et al., 1990). Ausserdem kann noch zwischen Alkaloiden (charakteristisches Enzym: Dimethylallyltryptophansynthase, DMATS) und Terpenen (Terpen Cyclase) unterschieden werden.

In Pilzen sind die für die Synthese benötigten Gene meistens in Genclustern angeordnet. Diese können mehr als 10.000 bp umfassen mit jeweils bis zu 2000 bp langen intergenischen Bereichen (Smith et al., 1990; Trail et al., 1995). Die Entstehung solcher pilzlicher Gencluster wird in horizontalem Gentransfer von Prokaryoten zu Eukaryoten vermutet. Zu der Frage, warum diese Gencluster über lange Zeit erhalten bleiben, obwohl das restliche Genom stetig Veränderungen erfährt, gibt es verschiedene Hypothesen. Die plausibelste Erklärung scheint jedoch, dass das Erhalten der Cluster-Struktur auch die Erhaltung der Gene des jeweiligen Biosyntheseweges und somit des Sekundärmetaboliten selbst bewirkt, was dem produzierenden Organismus einen selektiven Vorteil verschafft (Walton, 2000).



**Abbildung 1.1: Regulatorisches Netzwerk von Sekundärmetabolit-Genclustern.**

Die Regulation von pilzlichen Genclustern, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, ist sehr komplex. Globale Transkriptionsfaktoren werden durch externe Stimuli wie pH-Wert oder Nährstoffmangel aktiviert und regulieren viele verschiedene Gene, darunter auch weitere regulatorische Proteine. Diese regulieren wiederum spezifische Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation des jeweiligen Genclusters zuständig sind. Abbildung verändert übernommen aus (Brakhage, 2013).

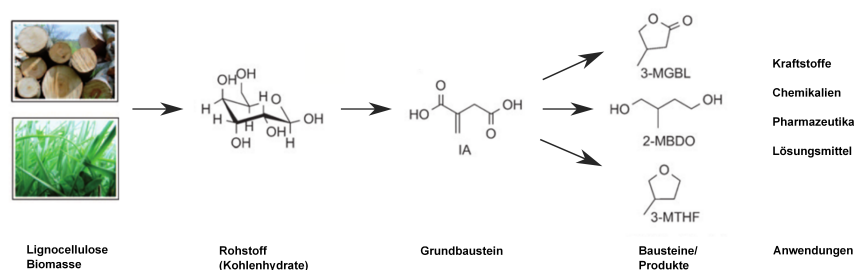
Das Rückgrat dieser Gencluster wird von einem oder mehreren zentralen Enzymen, die für die Synthese des Moleküls essentiell sind, gebildet. Bei einem Großteil der Gencluster handelt es sich dabei um Polyketid-Synthasen (PKS) oder nicht-ribosomale Peptid-Synthasen (NRPS), die die Kernstruktur des jeweiligen Moleküls synthetisieren. Anhand des Vorkommens dieser Enzyme im Genom konnten durch bioinformatische Analysen bereits viele Gencluster für Sekundärmetabolite identifiziert werden (Khaldi et al., 2010; Medema et al., 2011). Zusätzlich können Proteine, die die Kernstruktur weiter modifizieren, sowie Transporter oder regulatorische Proteine in einem Gencluster vertreten sein.

Pilzliche Sekundärmetabolit-Gencluster sind häufig komplex reguliert. Die Aktivierung der Gene erfolgt meist durch einen externen Stimulus wie Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle, pH-Wert, Licht, Temperatur sowie andere Umwelteinflüsse (Drew and Wallis, 1983; Tilburn, 1995). Die Regulation der Gencluster erfolgt dabei auf verschiedenen Ebenen und ergibt ein komplexes Netzwerk aus globalen und spezifischen regulatorischen Proteinen (Abbildung 1.1). Bei den globalen Regulatoren handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die keinem Gencluster angehören und viele verschiedene Gene regulieren, auch solche, die nicht direkt im Sekundärmetabolismus involviert sind. Die Gencluster befinden sich am Ende der Signalkaskade dieses Netzwerks und werden häufig durch einen spezifischen Transkriptionsfaktor reguliert, der sich meist in direkter Nachbarschaft zu dem Gencluster oder sogar innerhalb des Clusters befindet. Da die Regulation der Cluster-Gene durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor erfolgt, weisen die Gene innerhalb des Clusters daher auch oft ein ähnliches Expressionsmuster auf und können so leichter identifiziert werden.



### 1.1.2 Der Sekundärmetabolit Itaconsäure als *bio-based chemical building block*

Die einfach ungesättigte Dicarbonsäure Itaconsäure (Methylenbernsteinsäure) wurde erstmals 1837 von Baup als Thermolyseprodukt der Citronensäure beschrieben (Baup, 1837). Es folgten weitere Vorschläge und Verfahren zur synthetischen Herstellung von Itaconsäure (Chiusoli, 1962; Berg and Hetzel, 1978), die sich jedoch wirtschaftlich kaum lohnten. Im Jahr 1932 wurde erstmals die Biosynthese von Itaconsäure durch den filamentösen Pilz *Aspergillus itaconicus* auf saurem Medium beobachtet (Kinoshita, 1932). Wenig später wurde dann *Aspergillus terreus* im Rahmen eines Screening-Programms als besserer Itaconat-Produzent identifiziert (Lockwood and Reeves, 1945). Dies führte auch zu ersten Versuchen, die Itaconsäure-Produktion in großem Maßstab durch biotechnologische Fermentationsprozesse zu realisieren (Nelson et al., 1952; Pfeifer et al., 1952). Nachdem das Interesse daran bis in die 1980er Jahre eher spärlich war, rückte die Optimierung dieser Prozesse in den letzten Jahren wieder verstärkt in den Fokus der Forschung, um der gestiegene Nachfrage an Itaconsäure auf dem weltweiten Markt nachkommen zu können.



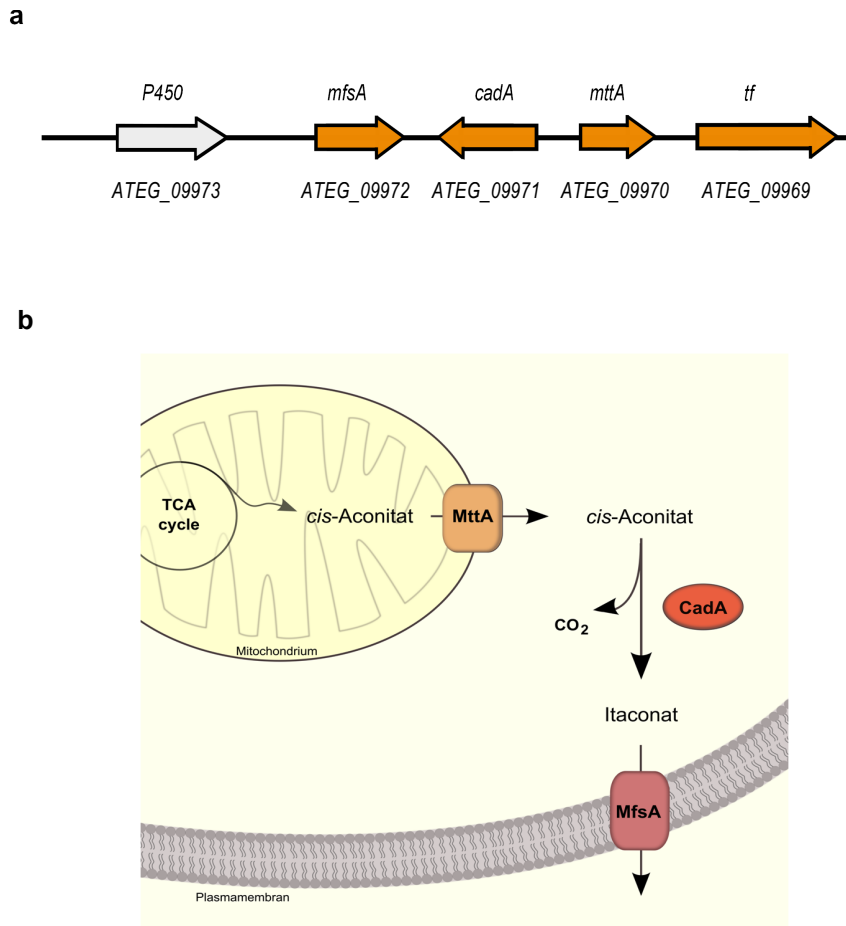
**Abbildung 1.2: Rolle der Itaconsäure in der Synthese von wirtschaftlich interessanten chemischen Verbindungen.**

Schematische Darstellung der Produktion von verschiedenen wirtschaftlich interessanten Chemikalien aus pflanzlicher Biomasse. Die pflanzliche Biomasse wird durch den in der Fermentation eingesetzten Organismus zu Itaconsäure (IA) verstoffwechselt. Itaconsäure dient dann als Grundbaustein für die Synthese von verschiedenen chemischen Strukturen, die beispielsweise Verwendung in der Produktion von Polymeren, Kosmetika oder Biokraftstoff finden. Abbildung verändert übernommen aus (Geilen et al., 2010).

Itaconsäure wird heutzutage industriell durch die Fermentation von *A. terreus* mit einer derzeitigen Produktionsrate von 80 g/L erzeugt (Willke and Vorlop, 2001). Sie wird vom amerikanischen Energieministerium als einer der Top 12 *bio-based chemical building blocks* (Werpy and Petersen, 2004; Lee et al., 2011) eingeschätzt, mit einem Produktionsvolumen von rund 80.000 t pro Jahr und einem Preis von etwa 2 US-Dollar pro Kilogramm (Okabe et al., 2009). Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften findet die Itaconsäure Verwendung als Grundbaustein in der Synthese von wirtschaftlich interessanten chemischen Verbindungen (Hermann and Patel, 2007). Ein Beispiel dafür ist der Einsatz in der Synthese von 3-methyl-tetrahydrofuran (3-MTHF), das durch thermische Behandlung von Itaconsäure entsteht und aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften ein idealer Kraftstoff für Verbrennungsmotoren ist (DoE, 1999; Voll and Marquardt, 2012). Da der Preis für Itaconsäure auf dem weltweiten Markt jedoch immer noch sehr hoch ist, wird in letzter Zeit verstärkt daran geforscht, Itaconsäure ökonomischer und kostengünstiger z. B. durch mikrobielle Fermentation von pflanzlicher Biomasse herzustellen (Abbildung 1.2) (Geilen et al., 2010; Klement et al., 2012).

### 1.1.3 Itaconsäurebiosynthese in *Aspergillus terreus*

Die industrielle Produktion von Itaconsäure findet seit den 1960er Jahren durch Fermentation des filamentösen Ascomyceten *Aspergillus terreus* in zuckerhaltigem Medium und unter Phosphat-limitierenden Bedingungen statt (Willke and Vorlop, 2001).



**Abbildung 1.3: Der Itaconsäure-Biosyntheseweg in *Aspergillus terreus*.**

**a** Schematische Darstellung des potentiellen Itaconsäure-Genclusters in *A. terreus*. Der Gencluster enthält neben dem *cadA*-Gen noch weitere Gene für einen Plasmamembran-Transporter der MFS-Familie (*mfsA*), einen mitochondrialen Transporter (*mttA*), sowie einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor (*tf*). **b** Schematische Darstellung des Itaconsäure-Biosyntheseweges. Das Citratzyklus-Intermediat *cis*-Aconitat wird vermutlich durch *MttA* aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert. Dort dient es *CadA* als Substrat, das die Decarboxylierung zu Itaconat katalysiert. Anschließend wird Itaconat möglicherweise über *MfsA* aus der Zelle sekretiert.

Der Biosyntheseweg der Itaconsäure ist in diesem Pilz bereits charakterisiert. Schon 1955 konnten Bentley und Thiessen eine katalytische Aktivität im Zellextrakt von *A. terreus* nachweisen, welche eine Umwandlung von *cis*-Aconitat zu Itaconat bewirkte (Bentley and Thiessen, 1955). Auf diese Weise konnte ein Biosyntheseweg postuliert werden, welcher durch radioaktive Markierungen von verschiedenen Substraten aus dem Citratzyklus bestätigt wurde (Bentley and Thiessen, 1957; Bonnarne et al., 1995). Später wurde das Gen *cadA*, das für das Enzym *cis*-Aconitat-Decarboxylase im Itaconsäure-Biosyntheseweg von *A. terreus* kodiert, identifiziert und

## 1 Einleitung

kloniert (Kanamasa et al., 2008; Li et al., 2011). Das CadA-Protein hat eine hohe Ähnlichkeit zu Proteinen der MmgE/PrpD-Familie, zu denen auch die 2-Methylcitrat-Dehydratase gehört. Dieses Enzym ist Bestandteil des Propionat-Abbauweges von Mikroorganismen und katalysiert die Dehydratisierung von 2-Methylcitrat zu 2-Methyлаconitat (Tabuchi and Hara, 1974; Horswill and Escalante-Semerena, 1997).

In *A. terreus* ist *cadA* vermutlich Teil eines kleinen Genclusters, der direkt neben dem Lovastatin Gencluster lokalisiert ist und ausser *cadA* noch Gene für ein Exportprotein der *Major facilitator superfamily* (MFS-Familie, *mfsA*), einen mitochondriellen Transporter (*mttA*), sowie einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor enthält (Li et al., 2011). Die Produkte dieser vier Gene sind für die Itaconsäure Biosynthese in *A. terreus* verantwortlich, bei dem zunächst *cis*-Aconitat aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert wird (Abbildung 1.3), da CadA dort lokalisiert (Jaklitsch et al., 1991). Im Cytosol wird *cis*-Aconitat von CadA als Substrat genutzt und zu Itaconat decarboxyliert, welches anschließend vermutlich mit Hilfe des Plasmamembran-Transporters MfsA aus der Zelle sekretiert wird.

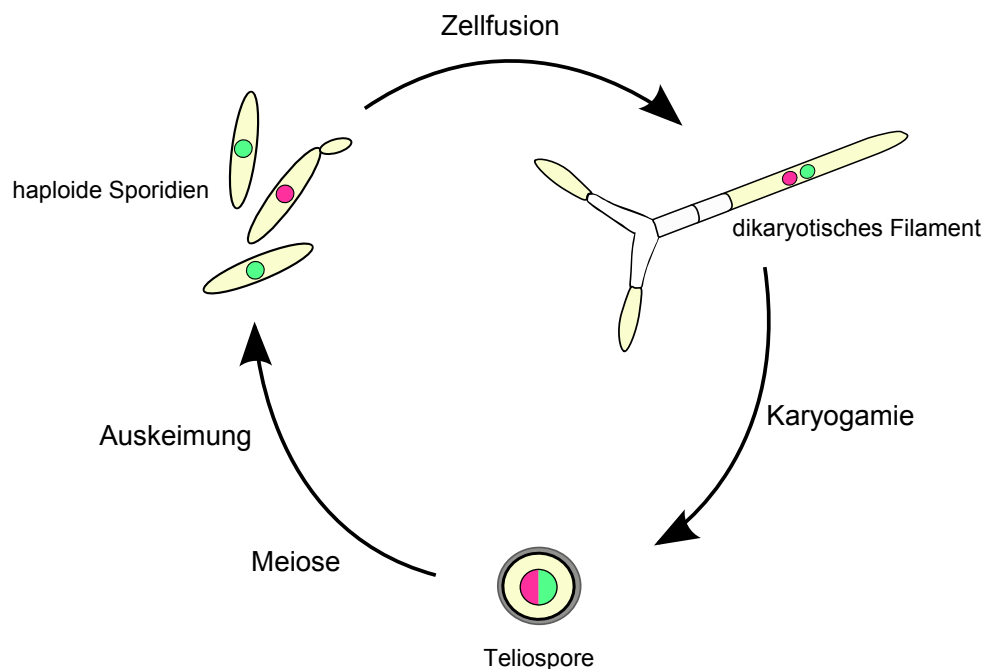
Der Transport von *cis*-Aconitat aus den Mitochondrien in das Cytosol, sowie die Sekretion von Itaconat durch MfsA sind immer noch spekulativ. Für den mitochondrialen Transporter wird jedoch ein Mechanismus wie für den Malat-Citrat-Antiporter angenommen (Jaklitsch et al., 1991). Es konnte bereits anhand von Transkriptomanalysen gezeigt werden, dass der mitochondriale Transporter *mttA* unter Itaconat-Produktionsbedingungen stärker exprimiert wird. Ausserdem zeigte eine Überexpression des Proteins einen direkten positiven Einfluss auf die Itaconat-Produktion von *A. terreus* (van der Straat et al., 2014), wodurch die Hypothese des Exports von *cis*-Aconitat bestärkt wird.

## 1.2 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

### 1.2.1 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

*Ustilago maydis* ist ein phytopathogener Brandpilz, der zur Ordnung der *Ustilaginales* in der Abteilung der *Basidiomycota* gehört. *U. maydis* hat dabei ein sehr enges Wirtsspektrum, das sich auf Maispflanzen und Teosinte beschränkt, wobei die Pflanzen an allen oberirdischen Teilen befallen werden können. Im Falle einer Infektion kommt es zur Ausbildung von Gallen, in denen die Entwicklung und Produktion der diploiden Teliosporen des Pilzes stattfindet.

*U. maydis* ist als Modellorganismus sehr gut geeignet, da die Genomsequenz des Pilzes vollständig bekannt ist und moderne Methoden der genomweiten Transkriptom- und Proteom-Analyse durchgeführt werden können. Ausserdem sind die Zellen im haploiden Stadium leicht zu kultivieren und für gentechnische Methoden leicht zugänglich (Steinberg and Perez-Martin, 2008). In den letzten Jahren hat *U. maydis* sich unter anderem für die Untersuchung vieler grundlegender Probleme bezüglich der Morphogenese und der Zellpolarität, aber auch in der Charakterisierung der Biosynthesewege von verschiedenen Sekundärmetaboliten bewährt.



**Abbildung 1.4: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.**

*U. maydis* ist ein pflanzenpathogener Pilz mit einem dimorphen Lebenszyklus. In seiner haploiden, saprophytischen Form vermehrt er sich durch hefeartige Knospung. Kompatible, haploide Sporidien können sich anhand eines Pheromon-Pheromonrezeptorsystems erkennen, dadurch aufeinander zuwachsen und an der Spitze zu einem dikaryotischen Filament fusionieren. Diese Form von *U. maydis* ist pathogen und kann mit Hilfe eines zuvor gebildeten Appressoriums die Maispflanze penetrieren. Innerhalb des pflanzlichen Gewebes wird dann die Ausbildung von Gallen induziert, in denen die Proliferation und die Bildung von diploiden Sporen erfolgt. Die reifen Gallen platzen schließlich auf und die Sporen werden durch Wind, Regen oder Tiere verteilt. Unter geeigneten Bedingungen können die Teliosporen dann wieder zu haploiden Sporidien auskeimen (nach (Kämper et al., 2006)).

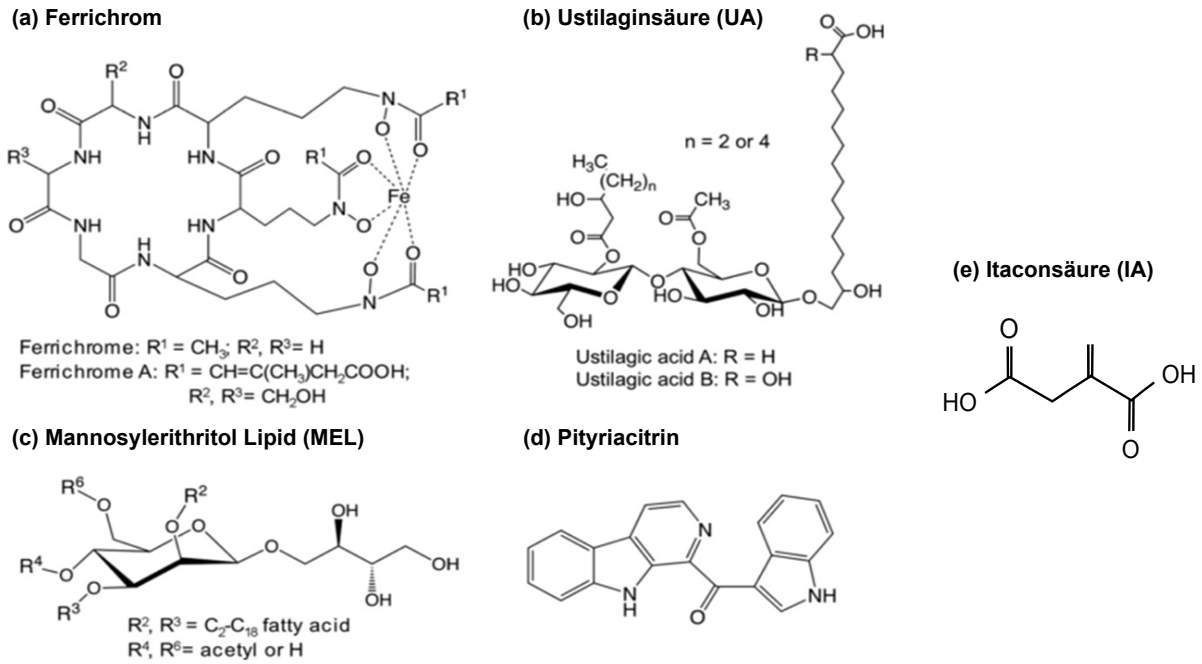
*U. maydis* hat einen dimorphen Lebenszyklus und wechselt dabei zwischen einer nicht-pathogenen haploiden und einer pathogenen diploiden Form (Abbildung 1.4). Die haploiden Zellen vermehren sich hefeartig durch Knospung.

Treffen zwei kompatible haploide Zellen auf der Pflanzenoberfläche aufeinander, erkennen sich diese über ein Pheromon-Rezeptorsystem. Dadurch kommt es zum Zellzyklusarrest und zur Ausbildung von sogenannten Konjugationsschläuchen, die sich entlang des Pheromongradienten orientieren und so aufeinander zuwachsen (Bölker et al., 1992; Snetselaar et al., 1996). Nach der Fusion der Zellen an der Spitze entsteht dann eine dikaryotische Infektionshyphe, die sich durch apikales Spitzenwachstum auszeichnet (Banuett and Herskowitz, 1994). Dabei wird der zytoplasmahaltige Teil der Hyphe durch Einzug von Septen gegen die entleerten Abschnitte abgegrenzt (Snetselaar et al., 1996). Anschließend werden an der Spitze der Hyphe Appressorien ausgebildet, mit deren Hilfe *U. maydis* mechanisch in die Pflanze eindringen kann. Im Meristem der befallenen Pflanze kommt es dann zur Induktion von Zellwucherungen. Diese führt zur Ausbildung von Gallen, die an allen oberirdischen Teilen der Pflanze auftreten können und in denen die Karyogamie und die Differenzierung zu stark pigmentierten diploiden Teliosporen erfolgt (Banuett and Herskowitz, 1994, 1996). Bricht der Tumor am Ende seiner Reifung auf, werden die Teliosporen durch Wind und Regen verbreitet. Die Teliosporen stellen dabei die Dauerform von *U. maydis* dar, die unter geeigneten Bedingungen auskeimen und nach Durchlauf der Meiose wieder zur Bildung der haploiden, saprophytischen Sporidien führen.

### 1.2.2 Sekundärmetabolismus in *U. maydis*

Wie viele andere Pilze besitzt auch *Ustilago maydis* Gencluster, die für die Produktion von Sekundärmetaboliten verantwortlich sind. Bereits in den 1950er Jahren wurde *U. maydis* als Produzent von verschiedenen interessanten Sekundärmetaboliten beschrieben, die insbesondere unter Stickstoff-limitierten Bedingungen identifiziert wurden (Haskins et al., 1955; Boothroyd et al., 1956). In dieser Zeit war man besonders an der Entdeckung neuer Antibiotika interessiert, die vor allem von Pilzen produziert werden. Dadurch geriet auch *U. maydis* als Produzent für bioaktive Stoffe in den Fokus der Forschung. Insbesondere die von Haskins identifizierte Ustilaginsäure (Abbildung 1.5a) zeigt antibiotische Wirkung, sowohl gegen pro- als auch eukaryotische Mikroorganismen (Haskins, R.H., and Thorn, 1951; Reed and Holder, 1953). Wenig später wurde aber festgestellt, dass die Ustilaginsäure nicht stabil genug ist, um in der Medizin Anwendung zu finden.

Der Biosyntheseweg der Ustilaginsäure wurde bereits gut charakterisiert. Die für die Produktion verantwortlichen Gene sind dabei in einem relativ großen Gencluster angeordnet, der aus 12 Genen besteht und durch den spezifischen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rua1 reguliert wird (Teichmann et al., 2007, 2010). Die Produktion der Ustilaginsäure, sowie einiger anderer Sekundärmetabolite, wird durch Stickstoffmangel induziert (Boothroyd et al., 1956). Strukturell setzt sich die Ustilaginsäure aus einem Gemisch aus Cellobioselipiden zusammen, wobei das Disaccharid Cellobiose o-glycosidisch mit der  $\omega$ -Hydroxylgruppe einer langkettigen Hydroxyfettsäure verknüpft ist (Lemieux et al., 1951).



**Abbildung 1.5: Übersicht der von *U. maydis* produzierten Sekundärmetabolite.**

*U. maydis* ist in der Lage unter bestimmten Bedingungen verschiedene Sekundärmetabolite zu produzieren. **a** Ferrichrome sind Eisen-Chelatoren und agieren als Siderophore zur Eisen-Beschaffung und Speicherung. **b** Die Ustilaginsäure ist ein Cellobiose-Lipid und hat antibiotische Eigenschaften. **c** MELs haben amphipathische Eigenschaften und finden als oberflächenaktive Stoffe Verwendung. **d** Pityriacitrin wird spontan in wässriger Lösung produziert, wenn Tryptophan als einzige Stickstoffquelle genutzt wurde. **e** Die Itaconsäure ist ein vergleichsweise kleiner Sekundärmetabolit und wird unter Stickstoffmangel produziert. Der Biosyntheseweg in *U. maydis* wurde bisher nicht charakterisiert. Verändert übernommen aus (Bölker et al., 2008).

Neben der Ustilaginsäure, deren Produktion leicht durch die bei niedrigem pH-Wert ausfallenden nadelförmigen Kristalle zu erkennen ist, wurden bis heute noch weitere durch *U. maydis* produzierte Sekundärmetabolite identifiziert und charakterisiert. Dazu gehört eine weitere Klasse an extrazellulären Glykolipiden, die als Mannosylerythritol-Lipide (MEL) bezeichnet werden (Abbildung 1.5b) und strukturell nicht mit der Ustilaginsäure verwandt sind. MELs sind amphipathische Moleküle, die eine oberflächenaktive Wirkung haben: Sie wurden bereits 1955 als extrazelluläres Öl, das eine höhere Dichte als Wasser aufweist, beschrieben (Haskins et al., 1955).

Die Gene für die Produktion der MELs sind ebenfalls in einem Gencluster angeordnet, der aber nur fünf Gene umfasst (Hewald et al., 2006). Die Regulation der MEL-Synthese ist nicht bekannt, da noch kein spezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert werden konnte. Strukturell bestehen MELs im wesentlichen aus einem Disaccharid, das sich aus Mannose und Erythritol zusammensetzt, wobei die Mannoseeinheit mit zwei Fettsäureketten verschiedener Länge, sowie zwei Acetylgruppen verestert ist (Fluharty and OBrien, 1969; Hewald et al., 2005). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese von Glykolipiden in *U. maydis* zum Teil in Peroxisomen stattfindet und dort mit der Degradation von Fettsäuren verknüpft ist (Freitag et al., 2014).

Neben den zwei Klassen von Glycolipiden produziert *U. maydis* außerdem zwei verschiedene Siderophore (Abbildung 1.5c), die als Ferrichrom und FerrichromA bezeichnet und für die Aufnahme und Speicherung von Eisen benötigt werden (Budde and Leong, 1989). Bei Eisenmangel werden diese Siderophore in das umgebende Medium ausgeschieden, wo sie Eisen-Ionen komplexieren und anschließend von den Zellen über spezifische Transportsysteme wieder aufgenommen werden (Neilands, 1952). Für die Biosynthese der Siderophore in *U. maydis* sind mehrere Gencluster zuständig, die durch cAMP, Eisen und den eisenabhängigen Transkriptionsfaktor Urbs1 reguliert werden (Eichhorn et al., 2006).

Eine weitere Klasse von Sekundärmetaboliten, die von Basidiomyceten produziert werden, bilden die Indolpigmente (Mayser et al., 1998). Insbesondere *U. maydis* diente hier als Modellorganismus zur Aufklärung des Biosyntheseweges. Dabei wurde beobachtet, dass besonders viele farbige und fluoreszierende Verbindungen gebildet werden, wenn die Aminosäure Tryptophan als einzige Stickstoffquelle vorliegt (Zuther et al., 2008). Pityriacitrin z.B. ist ein Hauptbestandteil dieser Pigment-Mischung und ein sehr effektiver UV-Filter (Machowinski et al., 2006).

Bereits in den 1950er Jahren wurde noch ein fünfter Sekundärmetabolit identifiziert, der von *U. maydis* produziert wird. Dabei handelt es sich um die ungesättigte Dicarbonsäure Itaconsäure (Abbildung 1.5e), die unter Stickstoffmangel in den Kulturüberstand sekretiert wird (Haskins et al., 1955). Während die Biosynthese in anderen Pilzen wie *Aspergillus terreus* bereits relativ gut charakterisiert ist, wurden in *U. maydis* die für die Produktion verantwortlichen Gene bisher noch nicht identifiziert.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Itaconsäure-Biosyntheseweges und die Charakterisierung der daran beteiligten Gene in *U. maydis*. Dies wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Blank von der RWTH Aachen durchgeführt (Geiser, 2014). Während dieser Arbeit konnte noch ein zweiter kleinerer Gencluster identifiziert werden, der dem Itaconat-Gencluster sehr ähnlich ist. Dieser ist, im Gegensatz zum Itaconat-Gencluster, jedoch auch in nahe verwandten Pilzen wie *Sporisorium reilianum* vertreten. Ein Teil dieser Arbeit drehte sich daher auch um die Charakterisierung dieses zweiten Genclusters und seiner Funktion in *U. maydis*.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Biochemische Charakterisierung des Itaconsäure-Genclusters in *U. maydis*

#### 2.1.1 Ein Protein der PrpF-Superfamilie ist essentiell für die Itaconsäure-Biosynthese von *U. maydis*

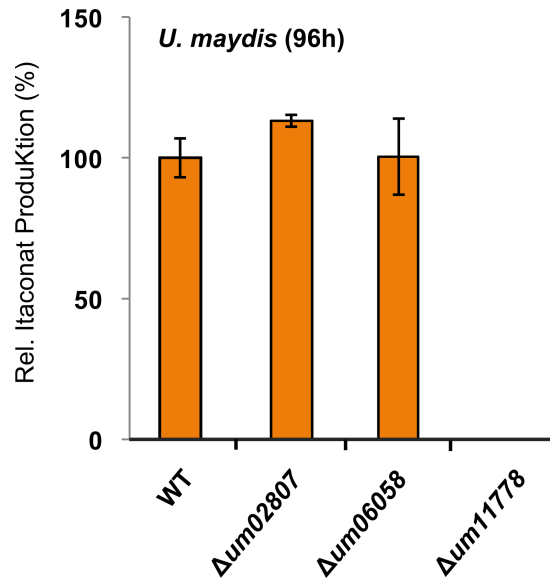
Die Fähigkeit, Itaconsäure zu produzieren, wurde für den phytopathogenen Basidiomyceten *U. maydis* bereits in den 1950er Jahren beschrieben (Haskins et al., 1955). Der Biosyntheseweg dieser ungesättigten Dicarbonsäure konnte jedoch für *U. maydis* bis jetzt noch nicht charakterisiert werden.

In dem filamentösen Ascomyceten *Aspergillus terreus*, der gegenwärtig zur industriellen Produktion von Itaconsäure genutzt wird, wurde der Itaconsäure-Biosyntheseweg über Jahre hinweg durch verschiedene Arbeitsgruppen aufgeklärt (Bentley and Thiessen, 1955; Bonnarme et al., 1995; Kanamasa et al., 2008; Li et al., 2011). In *A. terreus* wird die Itaconat-Synthese durch das Enzym *cis*-Aconitat-Decarboxylase (CadA) katalysiert, das *cis*-Aconitat zu Itaconat decarboxyliert (Kanamasa et al., 2008; Li et al., 2011). Dieses Enzym hat eine hohe Ähnlichkeit zu Methylcitratdehydratase, die die Dehydratisierung von 2-Methylcitrat zu 2-Methyлаconitat im Propionatabbauweg von Mikroorganismen katalysieren und zur Familie der MmgE/PrpD-Proteine gehören (Tabuchi and Hara, 1974; Horswill and Escalante-Semerena, 1997; Brock et al., 2000).

Der erste Schritt zur Aufklärung des Itaconsäure-Biosyntheseweges in *U. maydis* bestand daher in einer Genomanalyse. Während *A. terreus* neben *cadA* noch drei weitere Gene besitzt, deren Genprodukte zur PrpD-Familie gehören, konnte in *U. maydis* nur ein einziges Gen (*um06344*) identifiziert werden. *Um06344* codiert für ein Protein, das Ähnlichkeit zu CadA und damit zu PrpD-Proteinen aufweist (BLAST: 23%). Um die Funktion dieses Proteins in der Itaconsäure-Biosynthese zu charakterisieren, wurde eine Deletionsmutante von *um06344* generiert und deren Itaconat-Produktion analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Deletion dieses Gens in *U. maydis* zu keiner Veränderung in der Itaconsäure-Produktion führte. Auch eine Überexpression zeigte keinen Effekt auf die Produktionsrate (Maasem-Panakova, 2013). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass *um06344* vermutlich für eine Methylcitrat-Dehydratase und nicht für eine *cis*-Aconitat-Decarboxylase codiert. Daher muss die Biosynthese von Itaconat in *U. maydis* über einen alternativen Weg stattfinden.

Eine Literaturrecherche zeigte, dass die Funktion der Methylcitrat-Dehydratase PrpD im Propionat-Abbauweg einiger Bakterien, wie z.B. *Shewanella oneidensis*, durch eine kombinierte





**Abbildung 2.1: Itaconsäure-Produktion der Deletionsmutanten für die drei PrpF-ähnlichen Proteine in *U. maydis*.**

Dargestellt ist die Itaconsäure-Produktion der Deletionsmutanten für die drei PrpF-ähnlichen Proteine in *U. maydis* im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletion von *um11778* führt dabei zu einem Verlust der Itaconsäure-Produktion, während diese durch Deletion von *um02807* und *um06058* nur gering beeinflusst wird. Die hier gezeigten Daten wurden von Elena Geiser (AG Blank, RWTH Aachen) erhoben (Geiser, 2014).

Funktion der Enzyme AcnD und PrpF übernommen wird (Grimek and Escalante-Semerena, 2004). AcnD übernimmt dabei die Funktion einer Dehydratase, während PrpF als Isomerase wirkt, um das vermutlich entstehende 2-Methyl-*trans*-Aconitat zu 2-Methyl-*cis*-aconitat umzuwandeln (Garvey et al., 2007). Ein weiteres Enzym der PrpF-Familie, die 3-Methylitaconat- $\Delta$ -isomerase (Mii, EC 5.3.3.6) aus *Eubacterium barkerii*, katalysiert im Nicotinat-Abbauweg die Isomerisierung von 3-Methylitaconat zu Dimethylmaleat. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass Mii in der Lage ist Itaconat als Substrat zu nutzen und dieses in sein Isomer Citraconat umzuwandeln (Velarde et al., 2009).

Aufgrund dieser Tatsache wurde eine weitere Genomanalyse in *U. maydis* durchgeführt. Diese ergab, dass *U. maydis* drei Gene, *um11778*, *um02807* und *um06058*, besitzt, deren Produkte Ähnlichkeit zu Proteinen der PrpF-Familie aufweisen. Um zu überprüfen, ob diese Gene in der Itaconsäure-Biosynthese von *U. maydis* involviert sind, wurden Einzel-Deletionsmutanten in *U. maydis* erzeugt und diese auf ihre Itaconsäure-Produktion hin überprüft (Abbildung 2.1). Die Deletion von *um11778* führte zu einem Verlust der Itaconsäure-Produktion, während die Deletion der beiden anderen PrpF-ähnlichen Proteine keinen Effekt auf die Itaconsäure-Produktion von *U. maydis* hatte. Dies zeigt, dass *um11778* eine entscheidende Rolle in der Itaconsäure-Biosynthese von *U. maydis* spielt.

### 2.1.2 Charakterisierung des potenziellen Itaconsäure-Genclusters

Gene, die bei der Produktion von Sekundärmetaboliten eine Rolle spielen, sind in Pilzen oft in Genclustern angeordnet und weisen ein ähnliches Expressionsmuster auf (Walton, 2000;

## 2 Ergebnisse

Bok et al., 2006; Brakhage, 2013). Bei genauerer Betrachtung der genomischen Umgebung von *um11778* zeigte sich, dass *um11778* Teil eines solchen Sekundärmetaboliten Genclusters sein könnte. Durch Vergleich mit der Datenbank konnte das Gen oberhalb von *um11778* als ein Exportprotein der *Major Facilitator*-Superfamilie (MFS, *um11777*) mit Ähnlichkeit zu EmrD (*multi-drug-resistance*) aus *E. coli* (Tabelle 2.1) identifiziert werden. Unterhalb von *um11778* lokalisiert ein mitochondrieller Transporter (*um05079*), der mit dem Citrat-Transportprotein (CTP1) aus *S. cerevisiae* verwandt ist. Der Cluster wird an einer Seite durch ein Gen begrenzt, das für einen Transkriptionsfaktor der *basic-helix-loop-helix*-Familie (*um05080*) codiert. Interessanterweise war bereits in einer Überexpressionsstudie des Zink-Finger Transkriptionsfaktors Mzr1 aus *U. maydis* gezeigt worden, dass diese Gene gemeinsam reguliert sind (Zheng et al., 2008). Auch die Gene *um05074*, *um12299* und *um05076*, die ebenfalls in direkter Nachbarschaft zu *um11778* liegen, weisen ein ähnliches Expressionsmuster auf und ließen daher auf einen größeren Gencluster schließen. Bei *um05074* handelt es sich um ein Gen für eine P450-Monooxygenase, die Ähnlichkeit zur Phenylacetat-Hydroxylase *phacA* aus *A. nidulans* hat.

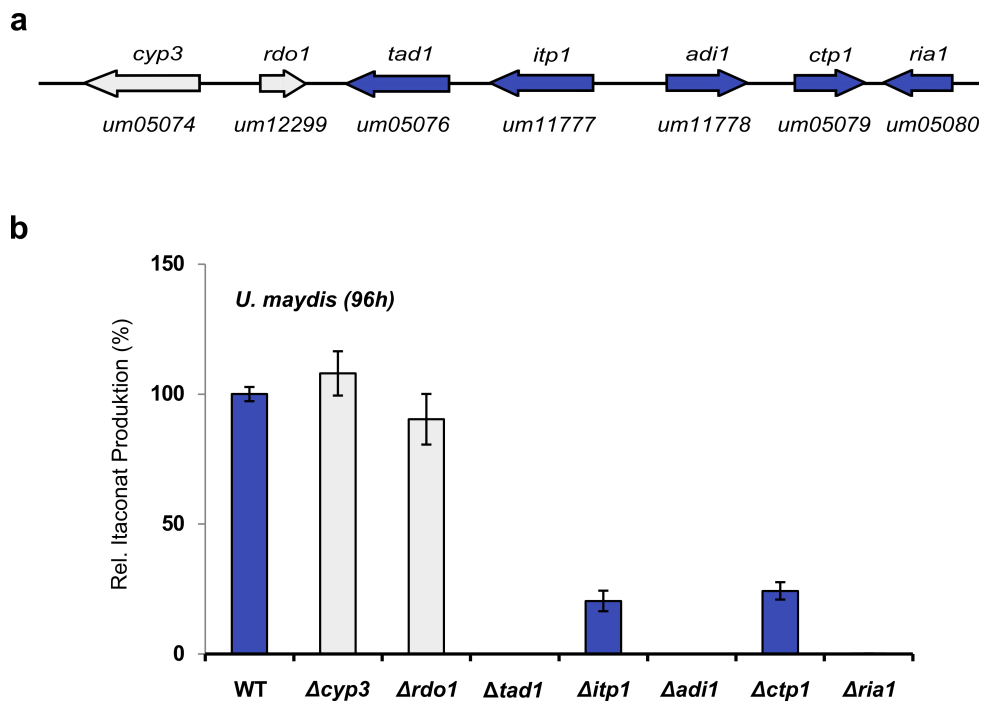
Gen-Nr.	Mögliche Funktion	Größe	Homolog mit bekannter Funktion	E-value	Strukturmotiv
<i>cyp3</i> (um05074)	Hydroxylierung von Paraconat	540	Phenylacetat Hydroxylase (CYP504 family) <i>A. nidulans</i> (Mingot et al., 1999)	9e-121	P450 Monooxygenase
<i>rdo1</i> (um12299)	unbekannt	180	Makrophagen Kolonisierungs-Faktor <i>Salmonella enterica</i> (Shi et al., 2006)	1e-37	Ring-spaltende Dioxygenase
<i>tad1</i> (um05076)	Decarboxylierung von <i>trans</i> -Aconitat	493	3-Carboxy- <i>cis,cis</i> -Muconat-lactonisierendes Enzym <i>Pseudomonas putida</i> (Yang et al., 2004)	3e-101	3-Carboxy- <i>cis,cis</i> -Muconat-lactonisierendes Enzym (CMLE)
<i>itp1</i> (um11777)	Export von Itaconat	491	EmrD multi drug resistance <i>E. coli</i> (PDB)	2e-11	Major Facilitator Familie (MFS)
<i>adi1</i> (um11778)	Isomerisierung von Aconitat	443	Oxalo-Mesaconat Tautomerase <i>Pseudomonas putida</i> (Nogales et al., 2011)	5e-72	PrpF-Familie
<i>ctp1</i> (um05079)	Mitochondrieller <i>cis</i> -Aconitat Export	300	Citrat Transport Protein (CTP1) <i>S. cerevisiae</i> (Kaplan et al., 1995)	3e-80	mitochondriales Transportprotein
<i>ria1</i> (um05080)	Regulator der Itaconat-Biosynthese Gene	362	upstream stimulatory factor 2 (USF2)(Gregor et al., 1990)	0.003	basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor

**Tabelle 2.1:** Analyse der Clustergene

## 2 Ergebnisse

Dieses Enzym katalysiert die Hydroxylierung von Phenylacetat und eine Deletion des Gens führt zur Überproduktion von Penicillin (Mingot et al., 1999). Das Gen *um12299* codiert für eine Ring-spaltende Dioxygenase, die mit einem Makrophagen Kolonisierungsfaktor aus *Salmonella enterica* verwandt ist. Bei dem letzten Gen, *um05076*, handelt es sich um ein 3-Carboxy-*cis,cis*-Muconat-lactonisierendes Enzym (CMLE). Diese Enzyme katalysieren die Lactonisierung von 3-Carboxy-*cis,cis*-Muconat im  $\beta$ -Keto adipatweg beim aeroben Abbau von aromatischen Verbindungen (Ornston and Stanier, 1966a).

Um die mögliche Funktion dieses potentiellen Genclusters in der Itaconsäure-Biosynthese zu untersuchen, wurden Deletionen der einzelnen Gene generiert. Dazu wurden zunächst homologe Bereiche von etwa 1000 bp, die das zu deletierende Gen links und rechts flankieren, mittels PCR amplifiziert. Durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* wurden diese Flanken mit einem geeigneten Vektor und einer Hygromycin-Resistenzkassette verknüpft. Dieses Konstrukt wurde zur Transformation von *U. maydis* genutzt, wodurch der offene Leserahmen des jeweiligen Gens über homologe Rekombination durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Anschließend wurden geeignete Transformanten einer Southern-Blot-Analyse unterzogen und die Itaconsäure-Produktion der so erhaltenen korrekten Mutanten analysiert.



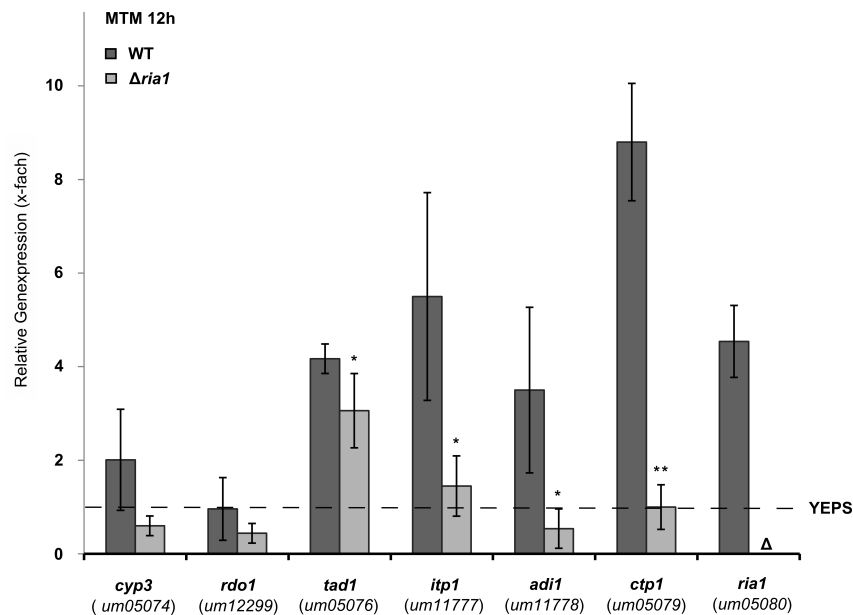
**Abbildung 2.2:** Übersicht der Itaconsäure-Produktion der einzelnen Deletionsmutanten des potentiellen Itaconsäure-Genclusters in *U. maydis*.

**a** Gezeigt ist die genomische Anordnung der Gene des potentiellen Itaconsäure-Genclusters in *U. maydis*. **b** Dargestellt ist die Itaconsäure-Produktion der einzelnen Deletionsmutanten in *U. maydis* im Vergleich zum Wildtyp. Neben der Deletion des PrpF-ähnlichen Proteins Um11778 führte auch die Deletion des Transkriptionsfaktors Um05080, sowie des Gens für das CMLE-ähnliche Protein Um05076 zu einem totalen Verlust der Itaconat-Produktion. Die Deletion der Gene *um11777* und *um05079*, welche für die beiden Transportproteine kodieren, führte zu einer starken Reduktion der Rate, während die Deletion von *um05074* und *um12299* keinen signifikanten Phänotyp aufwies. Die hier gezeigten Messungen wurden von Elena Geiser (AG Blank, RWTH Aachen) vorgenommen (Geiser, 2014).

Bei der Analyse konnten *um05076* und *um05080* als weitere, für die Itaconat-Biosynthese essentielle, Gene identifiziert werden (Abbildung 2.2). Die Deletion eines mitochondrialen Transporters (*um05079*) bzw. eines Plasmamembran-Transporters (*um11777*) führte jeweils zu einer etwa 50%igen Verminderung der Produktionsrate. Für die Deletion der Gene *um05074* (P450 Monooxygenase) und *um12299* (Ring-spaltende Dioxygenase) konnte kein Effekt auf die Produktionsrate beobachtet werden. Anhand der Deletionsanalyse konnte somit deutlich gezeigt werden, dass ein Gencluster für die Biosynthese von Itaconat in *U. maydis* verantwortlich ist.

### 2.1.3 Der Transkriptionsfaktor Um05080 reguliert spezifisch die Expression der Itaconsäure-Biosynthesegene

Gencluster werden häufig durch spezifische Transkriptionsfaktoren reguliert, die sich innerhalb oder in direkter Nachbarschaft zum betreffenden Gencluster befinden. Auch der potentielle Itaconsäure-Gencluster in *U. maydis* liegt in direkter Nachbarschaft zu einem transkriptionellen Regulator (*um05080*). Um die Regulation der Clustergene durch Um05080 zu charakterisieren, wurden quantitative RealTime-PCRs durchgeführt, mit deren Hilfe das mRNA-Level der jeweiligen Gene unter bestimmten Bedingungen ermittelt wurde.



**Abbildung 2.3: Transkriptlevel der Gene des Itaconsäure-Genclusters unter Itaconat-Produktionsbedingungen im Wildtyp und in der *ria1*-Deletionsmutante.**

Gezeigt sind die relativen mRNA-Level der einzelnen Gene des Itaconsäure-Genclusters unter Itaconat-Produktionsbedingungen in modifiziertem Tabuchi-Medium (MTM). Als Vergleich wurde die Expression der jeweiligen Gene für nicht-induzierende Bedingungen (12 h YEPS Vollmedium) herangezogen. Mit Ausnahme von *um12299* wird die Expression aller Gene in diesem Medium stark induziert. Die Deletion des Transkriptionsfaktors hat einen negativen Einfluss auf die Expression aller Gene, wodurch eine Abhängigkeit von der Regulation durch Rial1 gezeigt wird. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch einen einseitigen Student's-T-Test:  $<0,05 = *$ ;  $<0,01 = **$ ;  $<0,001 = ***$ .

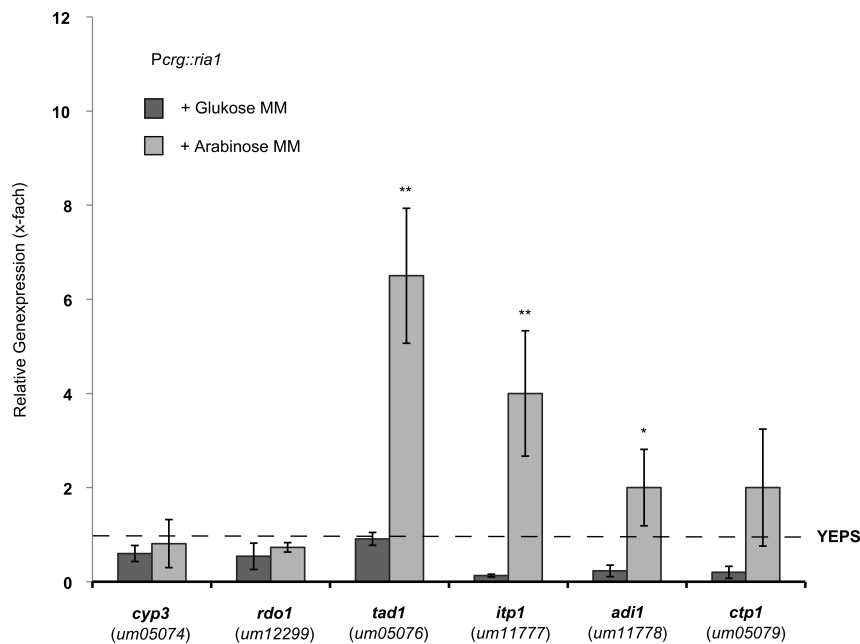
## 2 Ergebnisse

Dazu wurden der Wildtypstamm und die Deletionsmutante von *um05080* für 12 Stunden in modifiziertem Tabuchi-Medium (MTM) inkubiert, in dem es zur Induktion der Itaconsäure-Produktion kommt (Verduyn et al., 1992). Anschließend wurde die RNA der Zellen präpariert und die Expression analysiert.

Um eine relative Expression der Gene darstellen zu können, wurde die Expression im Wildtyp unter nicht induzierten Bedingungen (12 h YEPS-Vollmedium) auf den Wert 1 gesetzt und als gestrichelte Linie in der Abbildung dargestellt.

Die Auswertung der Daten ergab zunächst, dass, mit Ausnahme von *um12299*, alle Gene des potentiellen Itaconsäure-Genclusters unter Produktionsbedingungen mindestens 2-fach (*um05074*) induziert wurden (Abbildung 2.3).

Dabei fiel insbesondere das Gen für den mitochondrialen Transporter (*ctp1*) auf, das ein etwa 9-fach höheres Transkriptlevel nach Kultivierung in diesem Stickstoff-limitierten Medium gegenüber der Expression in Vollmedium (YEPS, gestrichelte Linie) aufwies. Auch die Expression des vermutlichen Exportproteins (*mfs*), sowie des Transkriptionsfaktors (*ria1*) war etwa 5 mal stärker. Die Gene *um05076* (*tad1*) und *um11778* (*adi1*) zeigten eine etwa 4-fach höhere Expression gegenüber dem Vollmedium.



**Abbildung 2.4: Einfluss des Transkriptionsfaktors Ria1 auf die Transkriptlevel der Gene des potentiellen Itaconsäure-Genclusters.**

Gezeigt sind die mRNA-Level der einzelnen Gene des Itaconsäure-Genclusters nach 6-stündiger Überexpression des Transkriptionsfaktors Ria1 in Minimalmedium (MM) mit Arabinose. Zur Kontrolle wurde der Stamm 6 Stunden in Minimalmedium mit Glukose inkubiert. Mit Ausnahme von *um05074* und *um12299* wurde die Expression aller Gene, insbesondere aber die von *um05076*, durch die Überexpression von *ria1* induziert. Die mRNA-Level von *ria1* wurden zur besseren Vergleichbarkeit der restlichen Daten in diesem Diagramm nicht gezeigt. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch einen einseitigen Students-T-Test:  $<0,05 = *$ ;  $<0,01 = **$ ;  $<0,001 = ***$ .

Nach Deletion des Transkriptionsfaktors Um05080 waren die Transkriptlevel aller Gene des potentiellen Genclusters im induzierenden Medium deutlich reduziert, sodass auch hier eine Abhängigkeit von Um05080 gezeigt werden konnte.

Insbesondere die Expression von *um05079* und *um11778* ist von Ria1 abhängig, da diese durch die Deletion von *ria1* um 90% bzw. 85% reduziert wurde. Auch das relative mRNA-Level von *um11777* wurde um etwa 70% stark reduziert und zeigt die Abhängigkeit von Ria1. Dagegen wurde das Expressionslevel von *um05076*, *um05074* und *12299* mit einer Verminderung um jeweils etwa 30% nur gering beeinflusst. Diese Daten weisen daraufhin, dass die Gene *um05076*, *um05074* und *12299* zusätzlich zur Kontrolle durch Um05080 vermutlich noch einer weiteren Regulation unterliegen.

Um zu analysieren, welchen Einfluss eine Überexpression des Transkriptionsfaktors Um05080 auf die Gene des potentiellen Genclusters hat, wurde *um05080* unter die Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotors *Pcrj* gestellt. Das so erstellte Konstrukt wurde dann in den *ip*-Locus des Wildtypstammes integriert.

Zur Analyse der mRNA-Level der entsprechenden Gene wurde dieser Stamm für 6 Stunden sowohl in Minimalmedium mit Glukose, als auch in Minimalmedium mit Arabinose inkubiert. Durch Zugabe von Arabinose wird der Promotor aktiviert und es kommt zu einer starken Überexpression von *um05080*. Anschließend wurde die RNA der Zellen präpariert und die Transkriptmenge analysiert.

Die Daten dieser Kulturen ergaben eine 7-mal stärkere Expression für *um05076* und für *um11777* eine etwa 4-mal stärkere gegenüber der normalen Expression in Vollmedium (YEPS) (Abbildung 2.4). Die Expression von *um11778* und *um05079* konnte dagegen durch die Überexpression von Um05080 nur verdoppelt werden. Durch die Induktion von *um05080* mit Arabinose wurde die Transkriptmenge dieses Gens auf das etwa 40-fache gesteigert.

Aus den hier gezeigten Daten kann geschlossen werden, dass die für die Itaconsäure-Biosynthese benötigten Gene in einem Gencluster angeordnet sind und hauptsächlich spezifisch durch den benachbarten Transkriptionsfaktor Um05080 reguliert werden. Aus diesem Grund wird das entsprechende Gen *um05080* als *ria1* (*Regulator of itaconic acid biosynthesis*) bezeichnet.

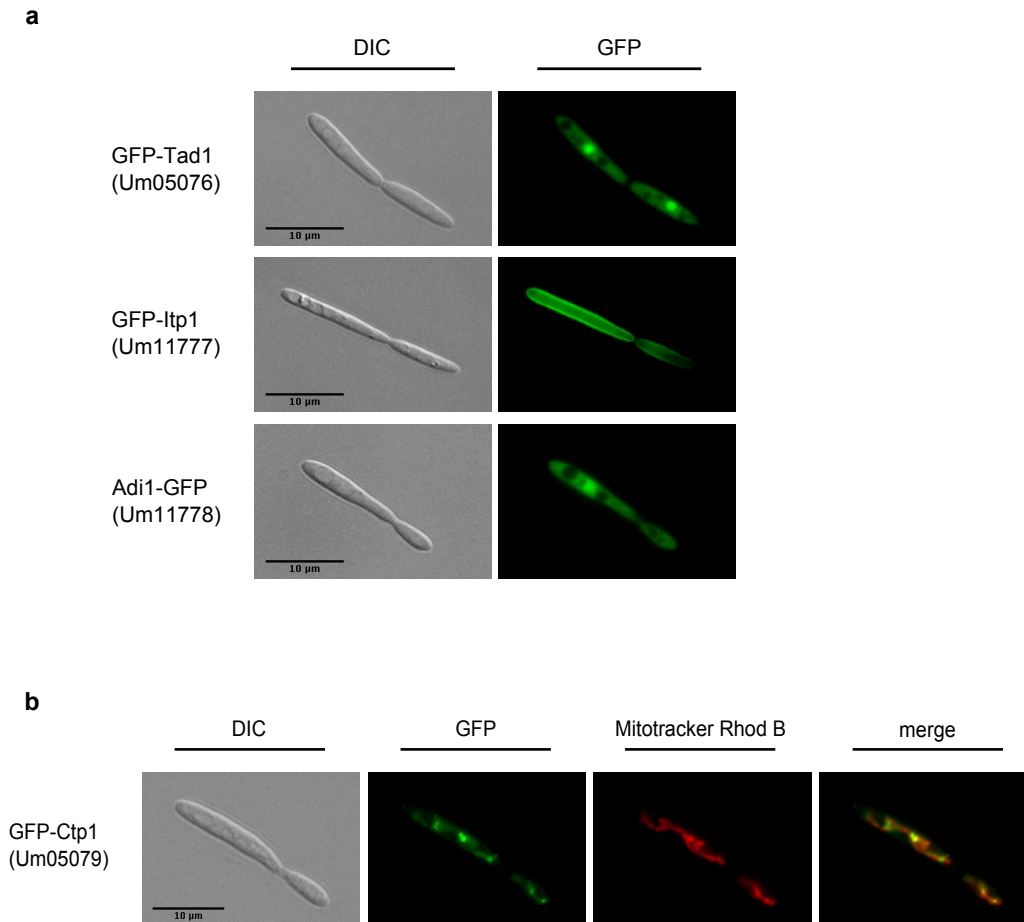
### 2.1.4 Lokalisierung der an der Itaconsäure-Biosynthese beteiligten Proteine

Die intrazelluläre Lokalisierung der an der Itaconsäure-Biosynthese beteiligten Proteine wurde analysiert, um einen Hinweis auf ihre Funktion zu erhalten. Dazu wurden GFP-Fusionen der Proteine in den entsprechenden Deletionsmutanten exprimiert.

Durch Fluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass GFP-Um05076 und Um11778-GFP im Zytoplasma und im Zellkern lokalisieren (Abbildung 2.5a). GFP-Um11777 dagegen lokalisierte deutlich an der äußeren Zellmembran. Diese Lokalisierung bestärkt die Vermutung, dass Um11777 die Funktion eines Itaconat-Exporters übernimmt. Aus diesem Grund wird das entsprechende Gen *um11777* als *itp1* (*itaconate transport protein*) bezeichnet.

GFP-Um05079 lokalisierte an Zellkompartimenten, die durch Kolokalisierung mit Mitotracker Rhodamine B als Mitochondrien identifiziert werden konnten (Abbildung 2.5b). Das Protein befand sich dabei nicht komplett im oder am Mitochondrium, sondern konzentrierte sich an

bestimmten Stellen dieses Kompartiments.



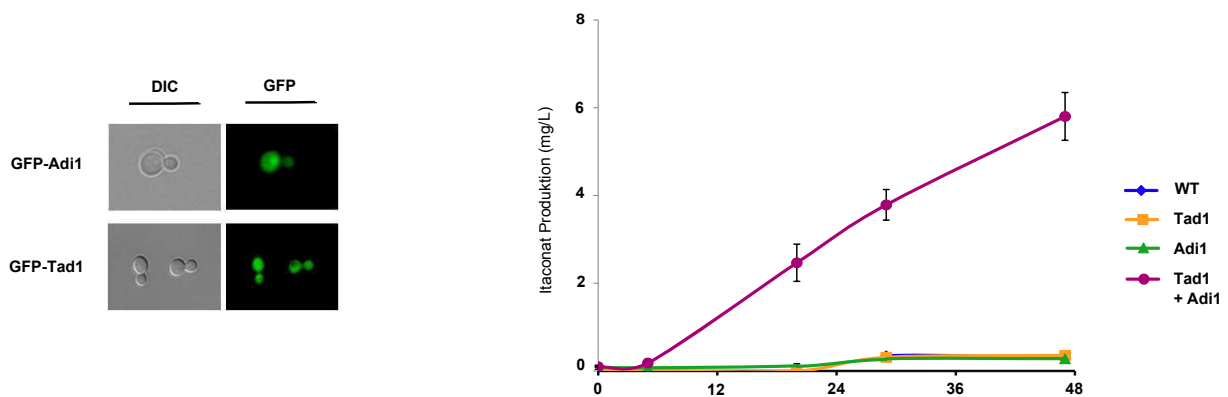
**Abbildung 2.5: Intrazelluläre Lokalisierung der an der Itaconsäure-Biosynthese beteiligten Proteine in *U. maydis*.**

**a** Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisierung der vier in die Itaconsäure-Biosynthese involvierten Proteine in *U. maydis*. Um05076 und Um11778 lokalisieren im Cytoplasma, sowie im Zellkern. Das potentielle Itaconat-Exportprotein Um11777 (Itp1) lokalisiert an der Plasmamembran. **b** Durch Färbung der Mitochondrien mit Mitotracker Rhodamine B konnte gezeigt werden, dass Um05079 (Ctp1) konzentriert an bestimmten Stellen von Mitochondrien lokalisiert.

Die beobachtete Lokalisierung an den Mitochondrien entspricht der Annotation von *um05079*, da es sich bei Um05079 vermutlich um einen mitochondrialen Tricarboxylat-Transporter handelt. Um die Funktionalität der GFP-Fusionsproteine zu testen, wurde die Itaconsäure-Produktion der entsprechenden Stämme analysiert (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte festgestellt werden, dass GFP-05076 die Deletion von *um05076* zumindest teilweise komplementieren kann. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Lokalisierung des Proteins im Cytoplasma korrekt ist. Für die übrigen Fusionsproteine konnte nicht gezeigt werden, dass diese funktionell sind. Dies liegt vermutlich daran, dass das GFP die Faltung des Proteins beeinflusst. Die hier beobachteten Lokalisierungen der beiden essentiellen Proteine Um05076 und Um11778 deuten darauf hin, dass die Itaconsäure-Biosynthese in *U. maydis* im Cytoplasma stattfindet, wie es auch schon für *A. terreus* beschrieben (Jaklitsch et al., 1991) wurde.

### 2.1.5 Expression des Itaconsäure-Genclusters aus *U. maydis* in *Saccharomyces cerevisiae*

Aus der Deletionsanalyse ging hervor, dass *um05076* und *um11778* für Enzyme kodieren, die für die Itaconsäureproduktion in *U. maydis* essentiell sind (Abbildung 2.2). Um zu analysieren, ob diese beiden Gene auch ausreichend sind, um Itaconsäure zu synthetisieren, wurden diese in dem heterologen Wirt *S. cerevisiae* exprimiert. Da *um11778*, im Gegensatz zu *um05076*, ein Intron enthält, wurde dieses zunächst durch einen PCR-Ansatz entfernt. Anschließend wurden die ORFs von *um05076* und *um11778* unter die Kontrolle des Galaktose-induzierbaren GAL4-Promotors gebracht und im Hefestamm ESM356 exprimiert. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* eignet sich für ein Experiment dieser Art besonders gut, da dieser Pilz nicht in der Lage ist, Itaconsäure selbst zu produzieren.



**Abbildung 2.6: Expression der *U. maydis* Itaconsäure-Biosynthese Enzyme in *S. cerevisiae*.**

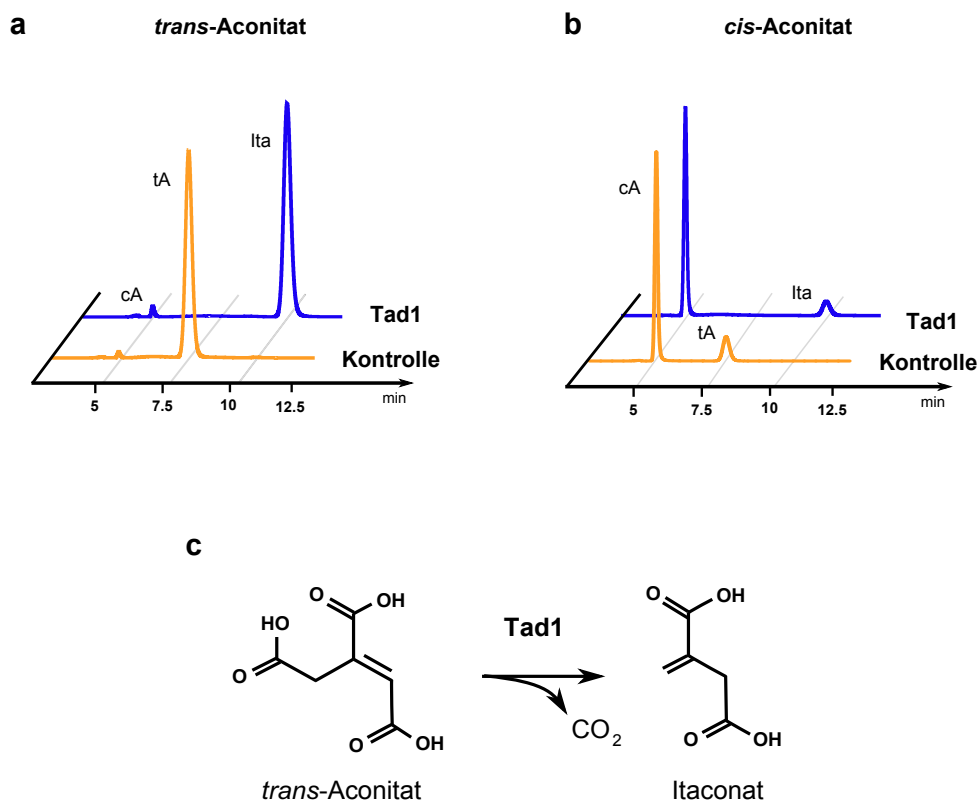
**a** Um05076 (Tad1) und Um11778 (Adi1) lokalisieren in *S. cerevisiae* ebenfalls im Cytoplasma und im Kern.  
**b** Die alleinige Expression von *um05076* (*tad1*) und *um11778* (*adi1*) hat keine Itaconsäure-Produktion in *S. cerevisiae* zur Folge. Wurden die beiden Gene jedoch koexprimiert, konnte Itaconsäure im Überstand detektiert werden. Die Messdaten wurden von E. Geiser (Geiser, 2014) erstellt.

Wurden die Hefestämme, in denen nur eines der beiden Gene exprimiert wurde, in Galaktosehaltigem Medium inkubiert, konnte nach 48 Stunden keine Itaconsäure im Überstand der Kultur detektiert werden (Abbildung 2.6a). Beide GFP-Fusionsproteine lokalisierten auch in *S. cerevisiae* sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus (Abbildung 2.6b). Durch diese Lokalisierungstudie, sowie durch Western-Blot Analyse, konnte gezeigt werden, dass die Proteine stabil in *S. cerevisiae* exprimiert werden und dies nicht der Grund für die fehlende Itaconsäure-Produktion war. Wurden die beiden Gene *um05076* (Tad1) und *um11778* (Adi1) in *S. cerevisiae* koexprimiert, konnte eine signifikante Itaconsäure-Produktion, wenn auch nur in vergleichsweise geringen Mengen, beobachtet werden. In diesem Experiment konnte somit gezeigt werden, dass die beiden Gene *um05076* (Tad1) und *um11778* (Adi1) ausreichend sind, um Itaconsäure auch in einem anderen Organismus zu synthetisieren. Außerdem wird damit auch deutlich, dass die Ausgangsverbindung für die Itaconat-Biosynthese Teil des normalen Stoffwechsels sein muss.



### 2.1.6 Das Gen *um05076* kodiert für eine *trans*-Aconitat-Decarboxylase

Da die Proteine Um05076 und Um11778 sowohl notwendig als auch ausreichend für die Itaconat-Biosynthese in *U. maydis* sind, sollte biochemisch charakterisiert werden, welche Reaktion diese beiden Enzyme katalysieren. Dazu wurden GST-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hilfe von Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose gereinigt.



**Abbildung 2.7: Katalytische Aktivität von Um05076 (Tad1).**

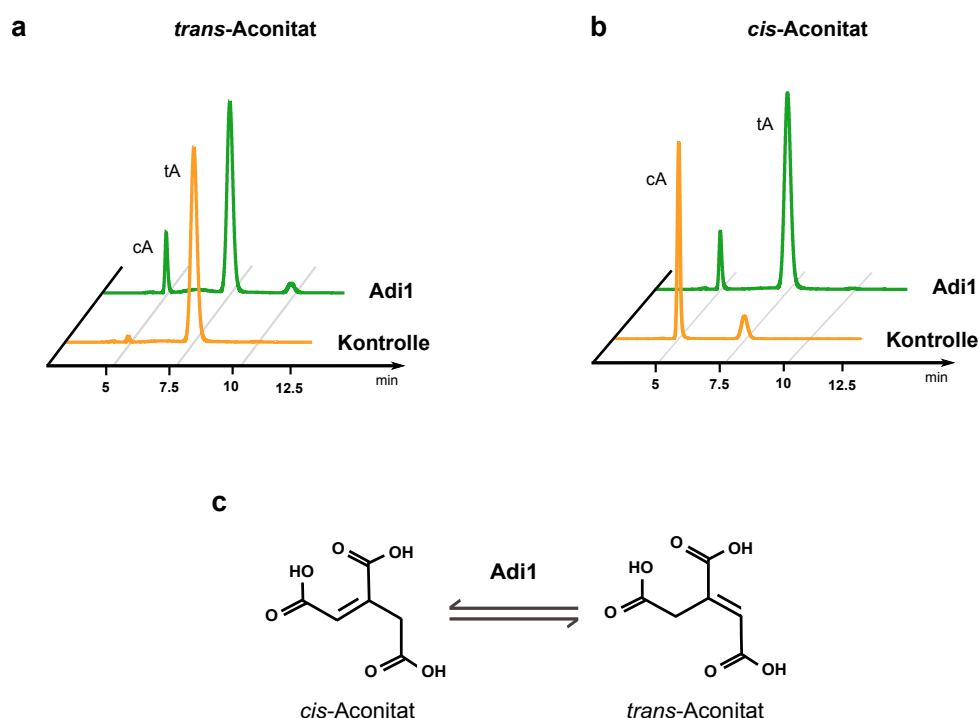
**a** Gezeigt ist eine Zusammenfassung der HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Um05076 (Tad1) mit *trans*-Aconitat (tA) als Substrat. Tad1 ist in der Lage, die vollständige Umwandlung von *trans*-Aconitat zu Itaconat (Ita) zu katalysieren. **b** *cis*-Aconitat (cA) kann als mögliches Substrat für Tad1 ausgeschlossen werden, da Tad1 nur den geringen, im *cis*-Aconitat natürlicherweise vorhandenen, *trans*-Anteil zu Itaconat umwandeln kann. **c** Schematische Darstellung der katalytischen Aktivität von Tad1. Tad1 katalysiert die Decarboxylierung von *trans*-Aconitat zu Itaconat.

Das gereinigte GST-Um05076 wurde anschließend mit verschiedenen potentiellen Substraten inkubiert und das entstandene Produkt über die HPLC analysiert. Als Substrat wurden die Intermediate des Zitronensäure-Zyklus Citrat, Isocitrat und *cis*-Aconitat eingesetzt. Außerdem wurde noch *trans*-Aconitat getestet. Dabei zeigte sich, dass nur *trans*-Aconitat von Um05076 als Substrat genutzt und zu Itaconat umgewandelt werden konnte (Abbildung 2.7a). Interessanterweise wurde für *cis*-Aconitat beobachtet, dass nur der geringe, im *cis*-Aconitat natürlich vorhandene, *trans*-Anteil von Um05076 zu Itaconat umgewandelt werden konnte (Abbildung 2.7b). Für alle anderen zugegebenen Substrate konnte keine Reaktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend ergibt sich, dass Um05076 die Decarboxylierung von *trans*-Aconitat zu Itaconat katalysiert (Abbildung 2.7c).

Daher wird Um05076 im Folgenden als *trans*-Aconitat-Decarboxylase (Tad1) und das entsprechende Gen *um05076* als *tad1* bezeichnet.

### 2.1.7 Das Gen *um11778* kodiert für eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase und katalysiert den ersten Schritt der Itaconsäure-Biosynthese in *U. maydis*

Da *trans*-Aconitat ein sehr ungewöhnliches Substrat darstellt, das natürlicherweise nicht in der Zelle vorkommt, wurde vermutet, dass Um11778 dazu dient *trans*-Aconitat bereitzustellen.



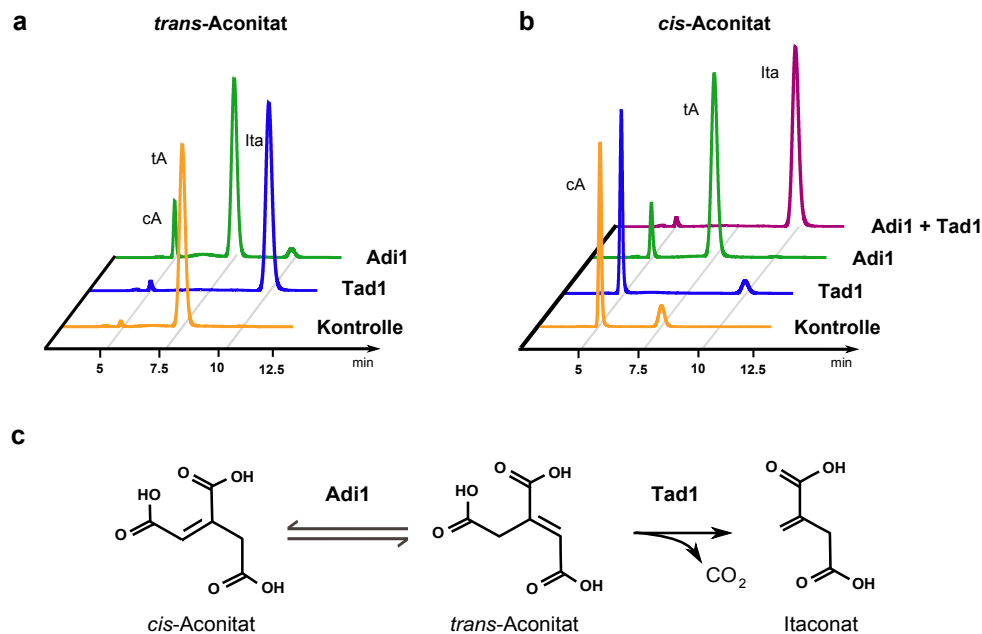
**Abbildung 2.8: Katalytische Aktivität von Um11778 (Adi1).**

**a** Gezeigt ist eine Zusammenfassung der HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Um11778 (Adi1) mit *cis*- (cA) und *trans*-Aconitat (tA) als Substrat. Adi1 ist in der Lage beide Substrate zu nutzen und durch Isomerisierung das chemische Gleichgewicht einzustellen, welches deutlich auf der Seite des *trans*-Aconitats liegt. **b** Schematische Darstellung der katalytischen Aktivität von Adi1. Adi1 katalysiert die Isomerisierung von Aconitat in beide Richtungen.

Wie bereits beschrieben, gehört Um11778 zur PrpF-Familie, deren Mitglieder unter anderem *cis-trans*-Isomerisierungen katalysieren (Grimek and Escalante-Semerena, 2004; Garvey et al., 2007). Aus diesem Grund wurde das gereinigte Protein mit *cis*- und *trans*-Aconitat als Substrat inkubiert und die Produkte erneut per HPLC analysiert. Die Analyse zeigte, dass Um11778 in der Lage ist, sowohl *cis*- als auch *trans*-Aconitat zu isomerisieren, wobei ein chemisches Gleichgewicht entsteht, welches mit 12:88 deutlich auf der Seite des *trans*-Aconitats liegt (Abbildung 2.8). Aufgrund dieses Ergebnisses kann festgestellt werden, dass *um11778* für eine Isomerase kodiert, die *cis*-Aconitat in *trans*-Aconitat umwandelt. Daher wird Um11778 im Folgenden als Aconitat- $\Delta$ -Isomerase (Adi1) und das entsprechende Gen *um11778* als *adi1* bezeichnet.

### 2.1.8 *In vitro* Itaconsäure-Biosynthese durch Adi1 und Tad1

Um zu überprüfen, ob die Biosynthese von Itaconat mit Hilfe der Enzyme Adi1 und Tad1 auch *in vitro* katalysiert werden kann, wurden die gereinigten Enzyme mit *cis*-Aconitat als Ausgangssubstrat inkubiert. Nach 15 minütiger Inkubationszeit konnte bereits eine vollständige Umsetzung von *cis*-Aconitat zu Itaconat beobachtet werden (Abbildung 2.9). Demnach konnte der Itaconsäure-Biosyntheseweg von *U. maydis* auch *in vitro* nachvollzogen werden. Da beide Enzyme im Cytosol lokalisieren, deuten diese Ergebnisse auch darauf hin, dass der mitochondrielle Transporter Um05079 den Export von *cis*-Aconitat aus den Mitochondrien katalysiert. Aus diesem Grund wird Um05079 im Folgenden als Ctp1 (*cis*-aconitate transport protein) und das Gen *um05079* als *ctp1* bezeichnet.



**Abbildung 2.9: Itaconsäure-Biosynthese durch Adi1 und Tad1 *in vitro*.**

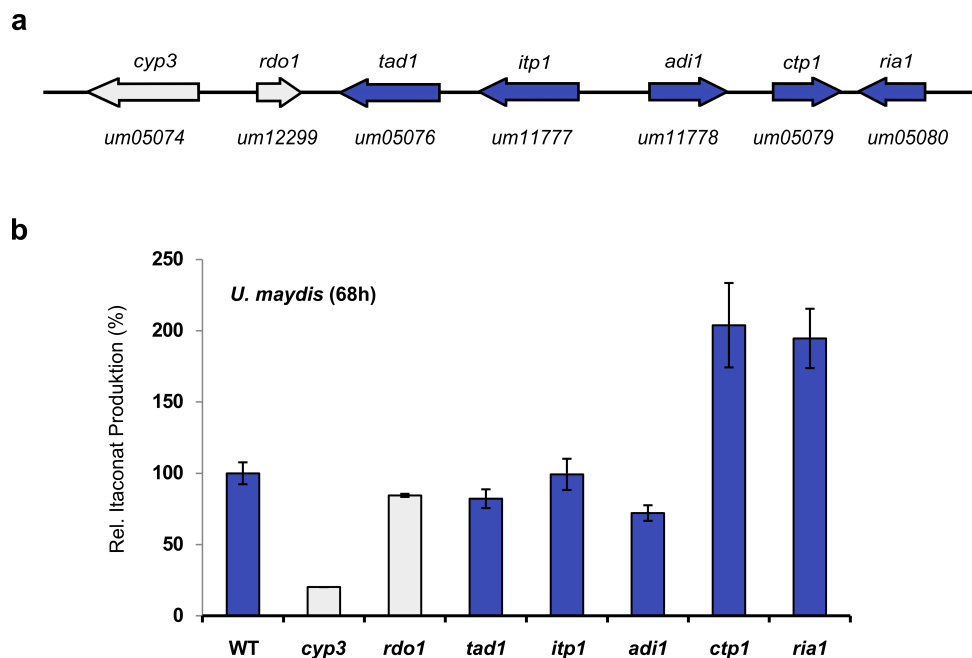
**a** Gezeigt ist eine Zusammenfassung der HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Adi1 und Tad1 mit *trans*-Aconitat (tA) als Substrat. **b** Gezeigt ist eine Zusammenfassung der HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Adi1 und Tad1 mit *cis*-Aconitat (cA) als Substrat. *cis*-Aconitat wurde durch die katalytische Aktivität der beiden Enzyme vollständig zu Itaconat (Ita) umgewandelt. **c** Schematische Darstellung des Itaconsäure-Biosyntheseweges in *U. maydis*. Adi1 katalysiert die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat (tA). *Trans*-Aconitat dient dann als Substrat für Tad1, welche die irreversible Decarboxylierung zu Itaconat katalysiert.

### 2.1.9 Die Überexpression von Ctp1 und Ria1 führt zu einer erhöhten Itaconsäure-Produktion

Die Charakterisierung des Itaconsäure-Genclusters erlaubt es nun, die Itaconat-Produktion durch Überexpression der beteiligten Enzyme zu steigern. Dazu wurden Stämme hergestellt, in denen die einzelnen Gene unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors *Petef* gebracht wurden. Anschließend wurden die Konstrukte in den *ip*-Locus des Wildtypstammes MB215 integriert, für 68 Stunden in MTM-Medium inkubiert und die Itaconsäure-Produktion per HPLC

analysiert (Abbildung 2.10).

Die Analyse ergab, dass insbesondere die Überexpression des mitochondrialen Transporters Ctp1 und des Transkriptionsfaktors Ria1 zu einer deutlichen Steigerung der Itaconsäure-Produktion um etwa 100% führte. Die alleinige Überexpression des Exportproteins Itp1 führte zu keiner offensichtlichen Änderung der Produktionsrate, während die Überexpression der Ring-spaltenden Dioxygenase Rdo1, der *trans*-Aconitat-Decarboxylase Tad1, sowie der Aconitat-Isomerase Adi1 zu einer leichten Reduktion des Itaconsäure-Levels führte. Die Überexpression der P450-Monooxygenase Cyp3 führte zu einer relativ starken Reduktion der Rate auf nur etwa 25% des Wildtyplevels. Dies war überraschend, denn Cyp3 konnte bisher keine Rolle in der Itaconsäure-Biosynthese von *U. maydis* zugewiesen werden. Die Kultivierungen, sowie die quantitativen Bestimmungen der Itaconsäure wurden von Elena Geiser (AG Blank, RWTH Aachen) durchgeführt (Geiser, 2014).



**Abbildung 2.10: Überexpression des Itaconsäure-Genclusters.**

**a** Gezeigt ist die genomische Anordnung der Gene des potentiellen Itaconsäure-Genclusters in *U. maydis*. **b** Die Überexpression von Ria1 und Ctp1 durch den konstitutiven *etef*-Promotor führt zu einer 100% höheren Produktionsrate. Überraschenderweise führt eine Überexpression der Monooxygenase Cyp3 zu einer starken Reduktion der Itaconsäure-Produktion, während die Überexpression der anderen Gene nur eine geringe Auswirkung hat.

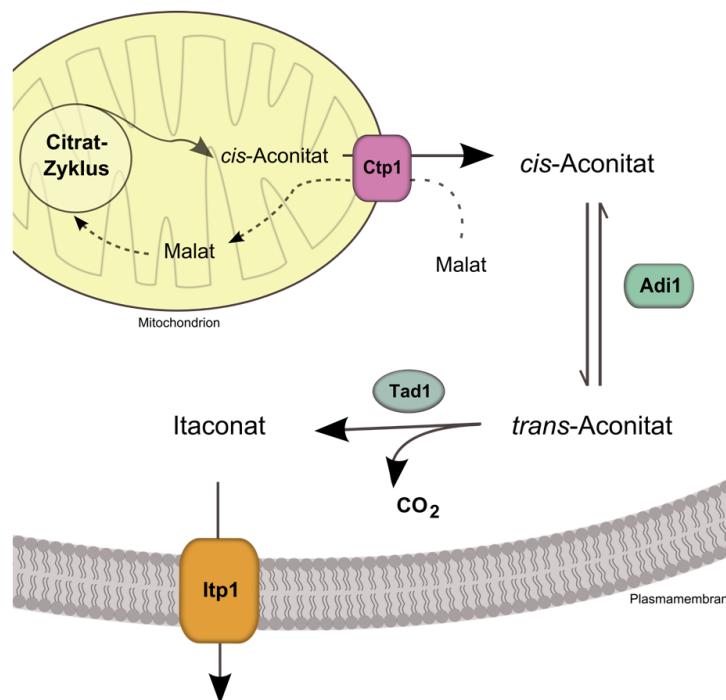
### 2.1.10 Modell des Itaconsäure-Biosyntheseweges in *U. maydis*

Die vorliegenden Daten erlaubten eine biochemische Charakterisierung des Biosyntheseweges für Itaconsäure in *U. maydis* und wurden zu einem Modell zusammengeführt. Das im Citrat-Zyklus gebildete Intermediat *cis*-Aconitat wird vermutlich durch den mitochondrialen Transporter Ctp1 aus den Mitochondrien ins Cytoplasma transportiert. Der Transportmechanismus wurde

bisher noch nicht charakterisiert, könnte jedoch zum Beispiel Ähnlichkeit zu dem Mechanismus der verwandten Citrat-Malat-Antiporter haben.

Dies würde bedeuten, dass *cis*-Aconitat im Austausch gegen Malat ins Cytoplasma exportiert wird und hätte den Vorteil, dass es gleichzeitig zu einer Auffüllung des Citrat-Zyklus kommen würde.

Im Cytoplasma dient *cis*-Aconitat als Substrat der Aconitat- $\Delta$ -Isomerase Adi1, die die Isomerisierung zu *trans*-Aconitat katalysiert. Das entstandene *trans*-Aconitat wird dann im Cytoplasma von Tad1 durch Decarboxylierung zu Itaconat umgewandelt. Schließlich wird das Itaconat vermutlich durch das Exportprotein Itp1 (Um1177) aus der Zelle transportiert. Auch der Transportmechanismus von Itp1 (Um1177), das zur Familie der *Major Facilitator* (MFS) gehört, ist bisher noch nicht charakterisiert. MFS-Proteine gehören zu den sekundär-aktiven Transportern, die den Transport von Zuckern und Metaboliten über Uniport, Symport oder Antiport katalysieren können (Pao et al., 1998; Law et al., 2009).



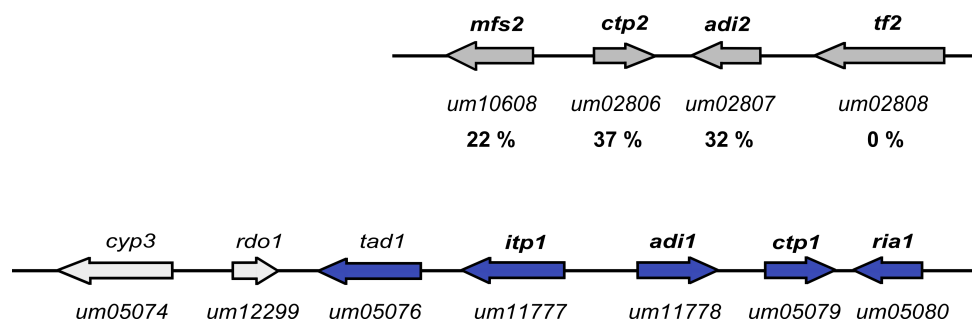
**Abbildung 2.11: Modell des Itaconsäure-Biosyntheseweges in *U. maydis*.**

Dargestellt ist der Itaconsäure-Biosyntheseweg in *U. maydis*. *Cis*-Aconitat wird vermutlich durch den Transporter Ctp1 aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert, wo es durch Adi1 zu *trans*-Aconitat isomerisiert wird. Dieses dient als Substrat für Tad1, die die Decarboxylierung zu Itaconat katalysiert. Itaconat wird schließlich vermutlich durch Itp1 aus der Zelle exportiert.

## 2.2 Charakterisierung einer weiteren Aconitat- $\Delta$ -Isomerase

### 2.2.1 Adi2 hat eine hohe Ähnlichkeit zu Adi1 und ist in einem potentiellen Gencluster organisiert

Bei der Suche nach PrpF-ähnlichen Proteinen im Genom von *U. maydis* wurden, neben Adi1, noch zwei weitere Proteine identifiziert, die eine hohe Ähnlichkeit zu dieser Familie haben (siehe Abschnitt 2.1.1). Die nähere Betrachtung der genomischen Umgebung ergab, dass eines dieser beiden Proteine, Um02807, ebenfalls in einem Gencluster organisiert sein könnte. Dieser liegt im Telomerbereich von Chromosom 6 und ist, im Gegensatz zum Itaconsäure-Gencluster, auch in nah verwandten Pilzen wie *Sporisorium reilianum* zu finden. Der potentielle Gencluster von *um02807* ist im Vergleich zum Itaconsäure-Gencluster deutlich kleiner, jedoch gibt es einige Gemeinsamkeiten (Abbildung 2.12). Ebenso wie im Itaconsäure-Gencluster ist ein Transportprotein der MFS-Familie (*um10608*), ein mitochondrialer Transporter (*um02806*), das PrpF-ähnliche Protein (*um02807*), sowie ein möglicherweise *Pathway*-spezifischer Transkriptionsfaktor (*um02808*) mit Ähnlichkeit zu einem Stickstoff-Assimilations-Faktor vorhanden. Der größte Unterschied zwischen den beiden Clustern besteht im Fehlen des Tad1-ähnlichen Proteins, das kritisch für die Itaconsäure-Produktion ist. Dies weist auf eine andere Funktion des potentiellen Gencluster von Um02807 hin, die im Folgenden näher charakterisiert wird.



**Abbildung 2.12: Der potentielle Adi2-Gencluster.**

Gezeigt ist die genomische Anordnung der Gene des potentiellen Adi2-Genclusters im Vergleich zum Itaconsäure-Gencluster in *U. maydis*. Neben *adi2* (*um02807*) enthält dieser möglicherweise noch ein Gen für einen Transporter (*um10608*) mit Ähnlichkeit zu Quinatpermeasen, ein Gen für einen mitochondrialen Transporter (*um02806*), sowie ein Gen für einen transkriptionellen Regulator (*um02808*). Die Prozentzahlen geben die Identität des Proteins zum jeweiligen Protein im Itaconsäure-Gencluster an (BLAST).

### 2.2.2 Die Überexpression von *adi2* kann den Phänotyp von $\Delta adi1$ retten

Um einen Hinweis auf die Funktion von Um02807 zu bekommen, wurde eine genauere Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen von Um02807 und Adi1 durchgeführt (Abbildung 2.13). Dabei konnte festgestellt werden, dass Um02807 genau wie Adi1 eine PrpF-Domäne besitzt, die sich in hohem Maße ähneln. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass es sich bei Um02807 ebenfalls um eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase handeln könnte.

Während die Deletion von *adi1* in *U. maydis* zu einem Verlust der Itaconsäure-Produktion führte, hatte die Deletion von *um02807* keinen Effekt.

um11778	-----M LHPIDTTIYRAGT	14
um02807	MLLQPTSSRHFEFRVYEPKILTKSALPIAPGATTAGASSSKSPSFERRSLRTVIMRAGT	60
	:.: *. * ****	
um11778	SRGLYFLASDLPAEPSEDAALISIMSGSHPL--QIDGMGGNSLTSKVAIVSASTQRSE	72
um02807	SKGLFIKASDLPSRAEWQNILPSIMSGSPDPFGRQLNGLGGGTSTTSKIAVVSQSSAPHI	120
	*:***: *****: . *: : * ***** .*: *:***:***.***:***:*** *	
um11778	FDVDYLFQCVGITERFVDTAPNCGNLMGVAFAIERGLVQP-----HPSD	118
um02807	ADVDFLFIQCPIEGDKLDFIGNCGNILSGVGPFQFEGLIPASVLAPLAAFAKNGKGRQ	180
	***** * * : : *****:***.***:***: . : :	
um11778	ITCLVRIENLNSRQASELVIPIVYNGR-VHYDDIDDMHMQRPSARVGLRFLDTVGSCTGKL	177
um02807	DKVALTLRCLNNQLIRSTFLVRNGKPFVEFGDVVIDGVAGTGSPIQLDFDPAGSMCTSL	240
	. : : ***.* . : : * ** : * : . : : : * * * * . * *	
um11778	LPTGNASDWIDG-----LKVSIIDSAVPVVFIRQHDVG--ITGSEAPATLNANTALLDR	229
um02807	CPTGKPLDLLHIHGEDLPFIEVSCVDAANPFVVRVLSIDIDETLRGNEPASVLERHS---AR	297
	***. * : . : ** : ** * : * * * : * * . : * . : . : : : *	
um11778	LERVRLEAGRRMGLG-----DVSGSVVPKLSLIG---PGTETITFTARYFTPKACHNAHA	281
um02807	VELIRQAAAVVMGLAPDTATAAKTKGTPKICLVSDALPGSDAHVLS-RSFSMGRPHPALQ	356
	: * : * * . ***. . . . * : . : . : * : : : * * : * *	
um11778	VTGAICTAGAAYIDGSVVCEILSSRASACSASQRRISIEHPSGVLEVLVPPENAAQSLV	341
um02807	LSGGVCLAAACSI PGSI PNQILLKQT---KMMPERLKFAHACGAIEA---TADVEMDSKS	410
	: : * : * . * . * : : * : . : . : * : . : * . : . : : *	
um11778	DVAVVERSIALIAHARVYYTTPDRRSYDSPLTSPSTPADTHNLFDAAYRPVIQPSDITDV	401
um02807	FVGVTVRSTSLFRTAR-----RLASAEAYYLSPSQ-----	440
	*. * . * * : : * * * * : : * * : : *	
um11778	EAPHMLALENKEQCVRCDTALHHIVASYGASDAHASDRSLS	443
um02807	-----	

PrpF-Domäne

Abbildung 2.13: Vergleich der Aminosäuresequenz von Adi1 (Um11778) und Adi2 (Um02807).

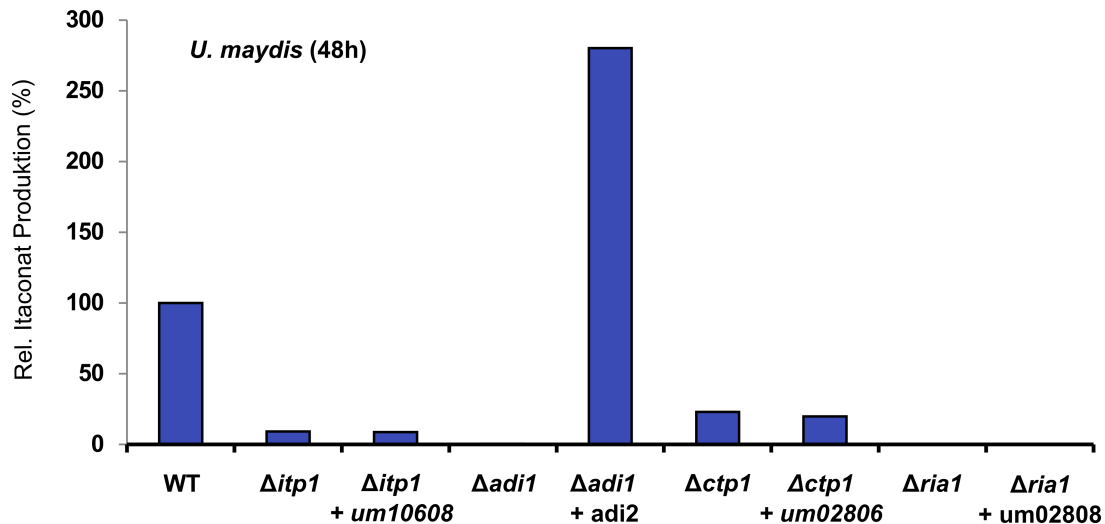
Dargestellt ist ein direkter Vergleich der Aminosäuresequenzen von Adi1 und Um02807. Um02807 besitzt genau wie Adi1 auch eine PrpF-Domäne, deren Sequenzen sich stark ähneln.

Um zu überprüfen, ob Um02807 in der Lage ist, die Funktion von Adi1 als *cis-trans*-Isomerase für Aconitat im Itaconat Biosyntheseweg *in vivo* zu ersetzen, wurde *um02807* in der *adi1*-Deletionsmutante unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *etef* überexprimiert (Abbildung 2.14). Dieses Experiment wurde auch für die restlichen Gene der beiden Cluster durchgeführt, die eine entsprechende Ähnlichkeit zueinander hatten. Dabei wurde beobachtet, dass die Überexpression von *um02807* zu einer Wiederherstellung der Itaconsäure-Produktion in der  $\Delta adi1$ -Mutante führte. Somit ist Um02807 in der Lage, die Funktion von Adi1 zu übernehmen. Es kann daher angenommen werden, dass es sich bei Um02807 ebenfalls um eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase handelt. Daher wird Um02807 im Folgenden als Adi2 und das entsprechende Gen als *adi2* bezeichnet. Interessanterweise, konnten die anderen Gene des Adi2-Genclusters die entsprechenden Funktionen der Itaconat-Biosynthesegene jedoch nicht ersetzen.

### 2.2.3 Adi2 ist eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase

Im vorhergehenden Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass Adi2 in der Lage ist, die Funktion von Adi1 *in vivo* bei der Itaconsäure-Biosynthese zu ersetzen. Um nun auch die enzymatische Aktivität biochemisch zu charakterisieren, wurde Adi2 als GST-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurde das gereinigte Protein mit *cis*- bzw. *trans*-Aconitat inkubiert und die Produkte mittels HPLC analysiert.





**Abbildung 2.14: Um02807 kann Adi1 *in vivo* funktionell ersetzen**

Dargestellt ist die relative Itaconat-Produktion der Itaconat-Deletionsstämmen, sowie der Deletionsstämmen, in denen die entsprechenden Gene des zweiten Genclusters unter der Kontrolle des *etef*-Promotors exprimiert wurden. Dabei wurde festgestellt, dass *um02807* den Effekt der Deletion von *Adi1* vollständig aufheben kann, während die Expression der anderen Gene keine Veränderung des jeweiligen Phänotyps zur Folge hatte.

Die Analyse zeigte, dass Um02807 genau wie *Adi1* in der Lage ist, sowohl *cis*- als auch *trans*-Aconitat zu isomerisieren, wobei ein chemisches Gleichgewicht entsteht, das deutlich auf der Seite des *trans*-Aconitats liegt (Abbildung 2.15a,b). Damit konnte auch für Um02807 eine enzymatische Aktivität als *cis-trans*-Isomerase für Aconitat gezeigt werden.

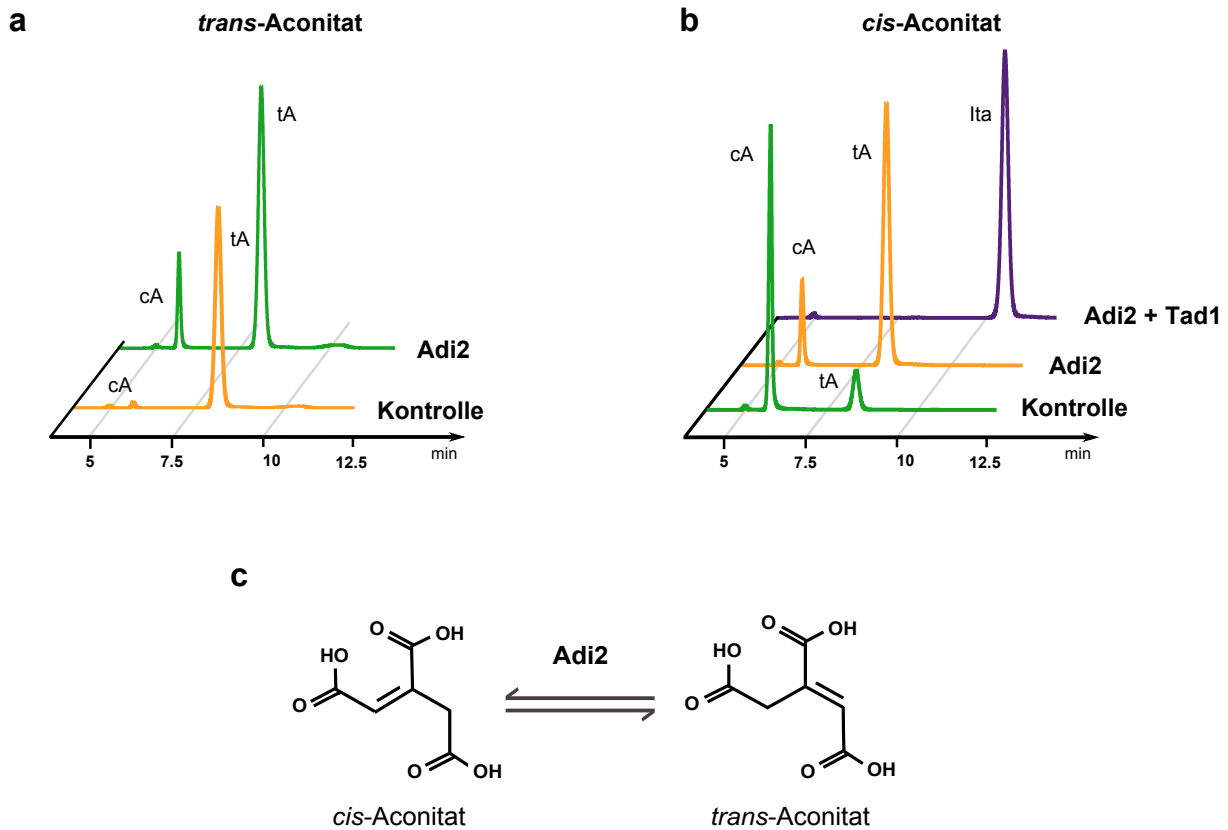
Im vorhergehenden Kapitel wurde auch bereits gezeigt, dass *Adi1* und *Tad1* gemeinsam in der Lage sind, *cis*-Aconitat *in vitro* in Itaconat umzuwandeln. Um zu überprüfen, ob diese *in vitro*-Synthese auch mit *Adi2* durchführbar ist, wurde dieses Experiment wiederholt und *Adi1* durch *Adi2* ersetzt. Nach 15 minütiger Inkubationszeit konnte auch in dieser Kombination eine vollständige Umsetzung von *cis*-Aconitat zu Itaconat beobachtet werden (Abbildung 2.15b). Dies bedeutet, dass *Adi2* die Funktion von *Adi1* auch bei der *in vitro* Itaconat-Biosynthese ersetzen kann.

#### 2.2.4 Der *Adi2*-Gencluster wird für die Verstoffwechselung von *cis*- und *trans*-Aconitat benötigt

Gencluster können nicht nur eine Rolle bei der Synthese von Metaboliten spielen, sondern auch beim Abbau bzw. bei der Verstoffwechselung von verschiedenen Molekülen. Um die Funktion des *Adi2*-Genclusters zu charakterisieren, wurden Wachstumstests auf Agarose in Verbindung mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Da *Adi2* bereits als *cis-trans*-Isomerase für Aconitat identifiziert werden konnte, wurde für den Test *cis*- bzw. *trans*-Aconitat als mögliches Substrat ausgewählt. Um weiterhin zu testen, ob Aconitat als Kohlenstoffquelle genutzt wird oder toxisch auf *U. maydis* wirkt, wurde das jeweilige Substrat auf Agaroseplatten mit und ohne Glukose in Kombination mit einer Stickstoffquelle verwendet (Abbildung 2.16).

Hierbei wurde festgestellt, dass *U. maydis* in der Lage ist, auf Agarose sowohl *cis*- als auch *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Auswertung des Experiments ergab,

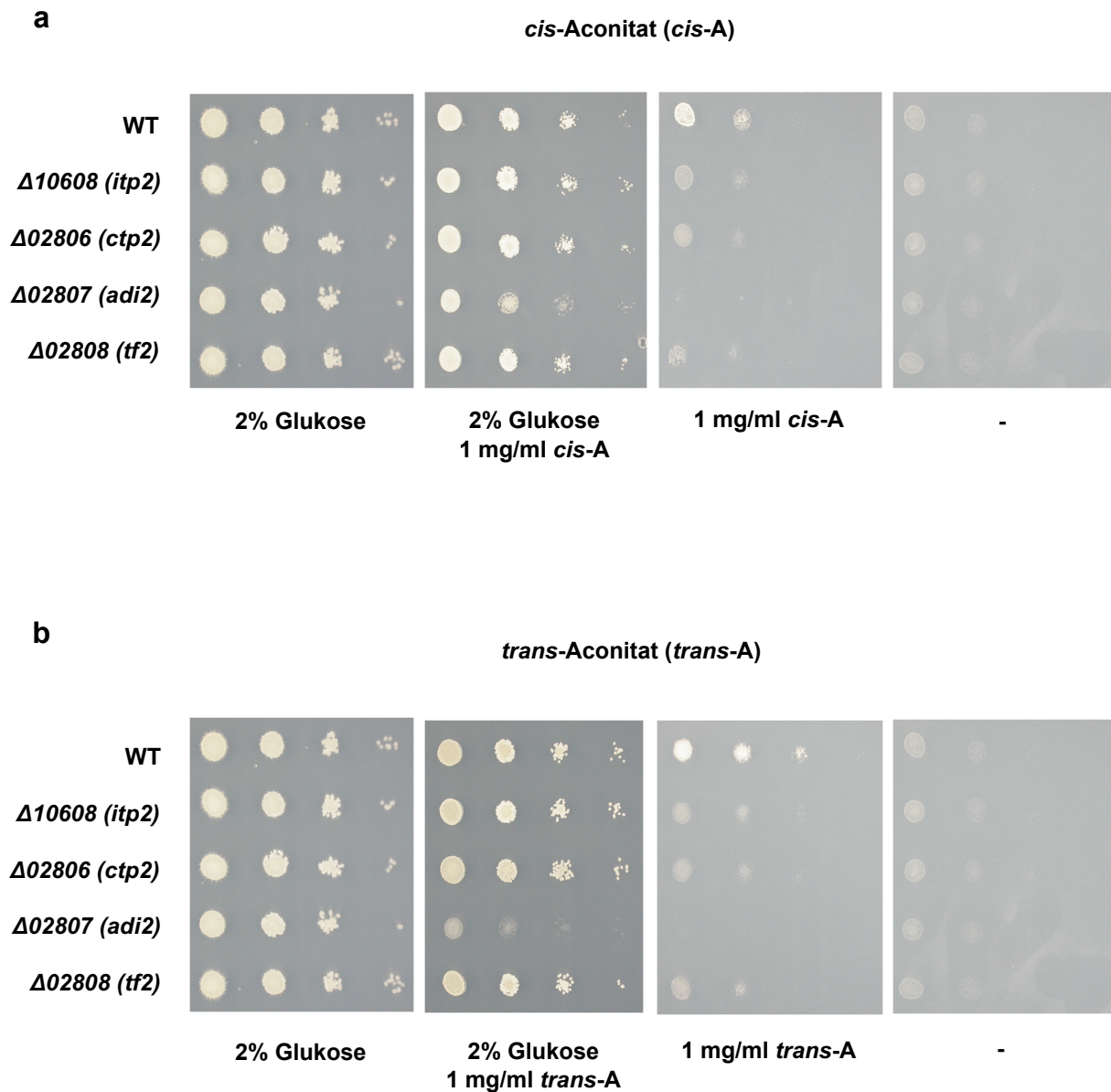




**Abbildung 2.15: Adi2 ist eine Aconitat- $\Delta$ -Isomerase**

**a** Gezeigt ist eine Zusammenfassung der HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Adi2 mit *trans*-Aconitat. Adi2 ist in der Lage dieses Substrat zu isomerisieren. **b** Ausserdem ist Adi2 auch in der Lage, die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu katalysieren. Nach Inkubation von *cis*-Aconitat mit Adi2 und Tad1 wurde dieses durch die katalytische Aktivität der beiden Enzyme vollständig zu Itaconat umgewandelt. **c** Schematische Darstellung der enzymatischen Aktivität von Adi2. Auch Adi2 katalysiert die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat in beide Richtungen.

dass das Wachstum durch Deletion der Transporter Um10608 (Mfs2) und Um02806 (Ctp2) bzw. des Transkriptionsfaktors Um02808 (Tf2) und auch der Aconitat- $\Delta$ -Isomerase Um02807 (Adi2) sowohl auf *cis*- als auch auf *trans*-Aconitat als einziger Kohlenstoffquelle stark beeinträchtigt wurde (Abbildung 2.16). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Deletion von *adi2* bereits in Kombination mit Glukose zu einem verminderten Wachstum führte. Dies bedeutet, dass *trans*-Aconitat eine toxische Wirkung auf *U. maydis* hat, sobald Adi2 nicht mehr vorhanden ist. Die anderen Deletions-Stämme sind dagegen scheinbar nicht mehr in der Lage, Aconitat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass der potentielle Adi2-Cluster eine Funktion in der Aufnahme und der Verstoffwechselung von Aconitat hat.



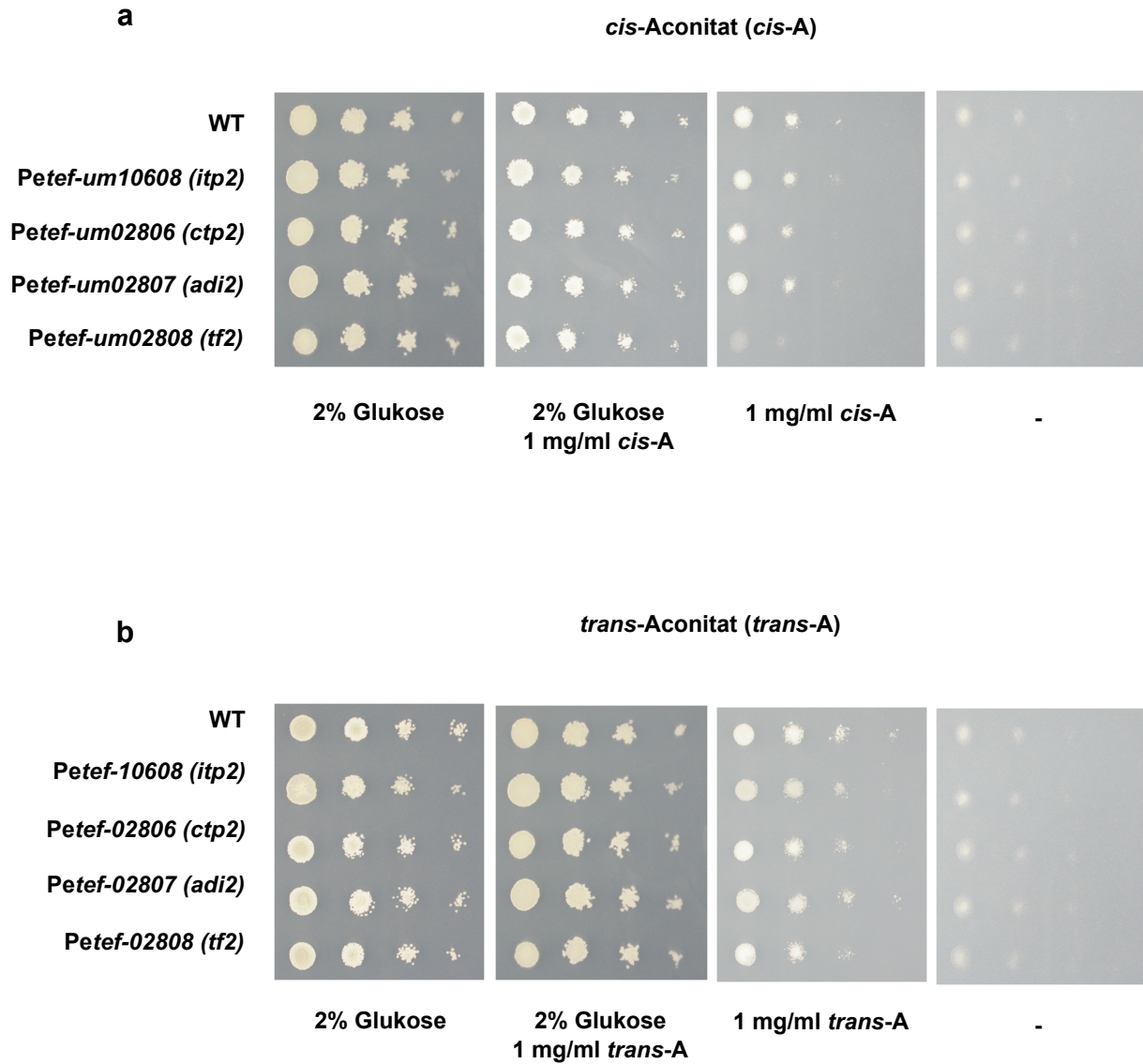
**Abbildung 2.16: Die Gene des *Adi2*-Genclusters werden für das Wachstum auf *cis*- und *trans*-Aconitat benötigt**

Gezeigt ist ein Wachstumstest der Deletionsmutanten des *Adi2*-Genclusters auf *cis*- (a) und *trans*-Aconitat (b). Während der Wildtyp sowohl auf *cis*- als auch auf *trans*-Aconitat wachsen kann, sind alle Einzel-Deletionsmutanten stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt. In allen Platten ist 0,2% Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle enthalten.

### 2.2.5 Die Überexpression des Transkriptionsfaktors führt zu einem reduzierten Wachstum auf *cis*-Aconitat

Im vorhergehenden Experiment konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von Genen des potentiellen *Adi2*-Clusters zu einer Beeinträchtigung des Wachstums auf Aconitat als Kohlenstoffquelle führt.

Um nun zu überprüfen, ob die Überexpression der entsprechenden Gene ebenfalls einen Effekt hat, wurde das Wachstumsverhalten der entsprechenden Stämme erneut auf *cis*- bzw. *trans*-Aconitat getestet.



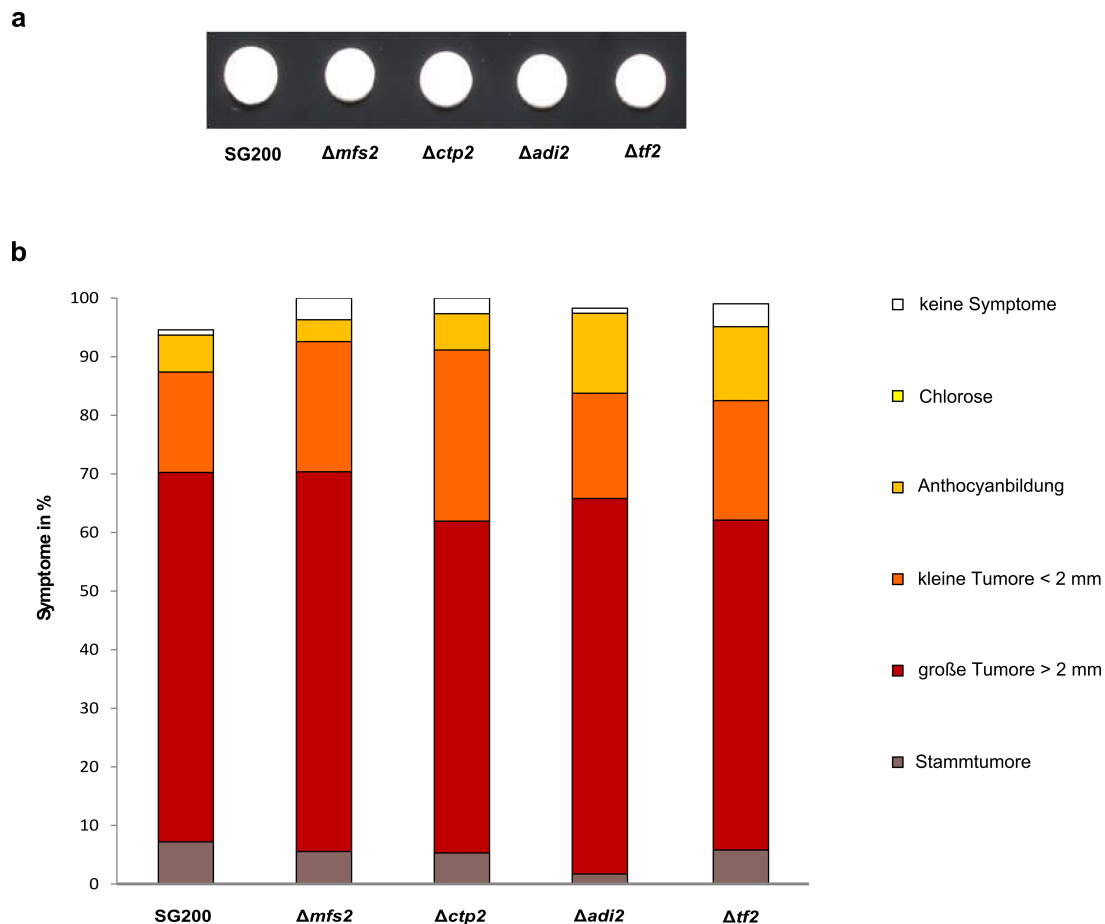
**Abbildung 2.17: Die Überexpression des Transkriptionsfaktors führt zu einem reduzierten Wachstum auf *cis*-Aconitat**

Gezeigt ist ein Wachstumstest der Überexpressionsstämme auf *cis*- (a) und *trans*-Aconitat (b). Auf *cis*-Aconitat kann dabei reduziertes Wachstum in Folge der Überexpression von Um02808 (Tf2) festgestellt werden, während auf *trans*-Aconitat kein Phänotyp vorliegt. Alle anderen Überexpressionsstämme zeigen normales Wachstum. In allen Platten ist 0,2% Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle enthalten.

Dabei zeigte sich, dass die Überexpression des Transkriptionsfaktors (*um02808*) auf *cis*-Aconitat einen Wachstumsdefekt aufweist, der auf *trans*-Aconitat jedoch nicht beobachtet werden konnte (2.17). Die anderen Stämme zeigten auf beiden Substraten Wildtyp-ähnliches Wachstum. Da in Kombination mit Glukose kein Phänotyp beobachtet werden konnte, handelt es sich hierbei vermutlich nicht um eine toxische Wirkung des *cis*-Aconitats auf den Überexpressionsstamm. Aus welchem Grund die Überexpression des transkriptionellen Regulators zu einem verminderten Wachstum nur auf *cis*-Aconitat, jedoch nicht auf *trans*-Aconitat führt, konnte bisher nicht geklärt werden.

### 2.2.6 Der potentielle Adi2-Gencluster ist für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* nicht essentiell

Durch die Auswertung von in der GEO-database verfügbaren Microarray-Daten konnte festgestellt werden, dass der Adi2-Gencluster während der biotrophen Phase von *U. maydis* stark exprimiert wird. Um zu testen, ob die Gene dieses potentiellen Genclusters eine Rolle in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* spielen, wurden Deletionsmutanten im Stamm SG200 erzeugt und Pathogenitätstests durchgeführt.



**Abbildung 2.18: Der Adi2-Gencluster hat keine essentielle Funktion während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*.**

**a** Gezeigt ist das filamentöse Wachstum der Deletionsmutanten auf aktivkohlehaltigem Medium. Es konnte kein Defekt beobachtet werden. **b** Übersicht des Infektionsverhaltens der Deletionsmutanten. Da kein Unterschied zu den Symptomen des Wildtypstammes SG200 festgestellt werden konnte, sind die Gene des potentiellen Genclusters nicht essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*.

Bei diesem Experiment wurde festgestellt, dass die Gene des Adi2-Clusters nicht für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell sind, da sich die gezählten Symptome der Deletionsmutanten nicht von denen des Wildtypstammes unterschieden (Abbildung 2.18b). Auch bei einem zusätzlich durchgeführten Test auf aktivkohlehaltigem Medium konnte für die Deletionsmutanten kein vom Wildtypstamm abweichender Phänotyp beobachtet werden (Abbildung 2.18a).

## 2 Ergebnisse

Die Deletion der Gene hat damit auch keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum von *U. maydis*.

In diesem Teil der Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Adi2 in einem Gencluster organisiert ist, der zwar für die Verstoffwechselung von *cis*- und *trans*-Aconitat essentiell ist, für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* jedoch keine Rolle spielt.

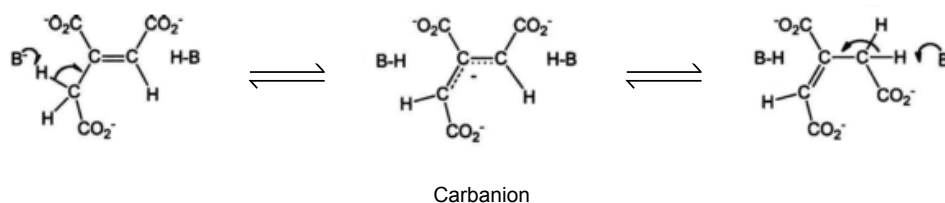
## 3 Diskussion

### 3.1 Biochemische Charakterisierung des Itaconsäure-Biosyntheseweges in *U. maydis*

#### 3.1.1 Die Itaconat-Synthese in *U. maydis* erfolgt in zwei Schritten

In dieser Arbeit konnte der Biosyntheseweg der ungesättigten Dicarbonsäure Itaconsäure in *U. maydis* vollständig aufgeklärt werden. Die Synthese von Itaconat erfolgt in zwei Schritten ausgehend von *cis*-Aconitat aus dem Zitratzyklus. Der erste Schritt wird dabei von der Aconitat- $\Delta$ -Isomerase Adi1 (Um11778) katalysiert, die die Umwandlung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat vermittelt. Die *trans*-Aconitat-Decarboxylase Tad1 (Um05076) katalysiert dann den zweiten Schritt der Decarboxylierung von *trans*-Aconitat zu Itaconat.

Die Aconitat- $\Delta$ -Isomerase Adi1 gehört zur Familie der PrpF-Proteine, die in den Methylcitratzyklus propionatabbauender Mikroorganismen involviert sind (Grimek and Escalante-Semerena, 2004). Während in den meisten Bakterien die Umwandlung von 2-Methylcitrat zu 2-Methyлаconitat durch eine Methylcitrat-Dehydratase der PrpD-Familie erfolgt, wird diese Reaktion in manchen Bakterien durch zwei Enzyme, AcnD und PrpF, katalysiert. Das AcnD-Protein übernimmt dabei die Funktion der Aconitase, während das PrpF-Protein als Isomerase fungiert, die in der Lage ist, eine *cis-trans*-Isomerisierung von Methyлаconitat zu katalysieren (Garvey et al., 2007). Eine ähnliche Funktion für ein Protein der PrpF-Familie wurde auch in *Eubacterium barkeri* beschrieben. Dort vermittelt es die reversible Konversion von (R)-3-Methylitaconat zu 2,3-Methylmaleat im Nicotinat-Abbauweg, die durch Verschiebung der Doppelbindung erreicht wird (Velarde et al., 2009).



**Abbildung 3.1: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Aconitat- $\Delta$ -Isomerase Adi1 aus *U. maydis***

Dargestellt ist ein hypothetischer Reaktionsmechanismus von Adi1. Adi1 könnte, wie von Klinman und Rose für die Aconitat-Isomerase aus *P. putida* postuliert, die allylische Umstrukturierung von Aconitat über ein transientes Carbanion katalysieren. Abbildung verändert übernommen aus (Garvey et al., 2007).

### 3 Diskussion

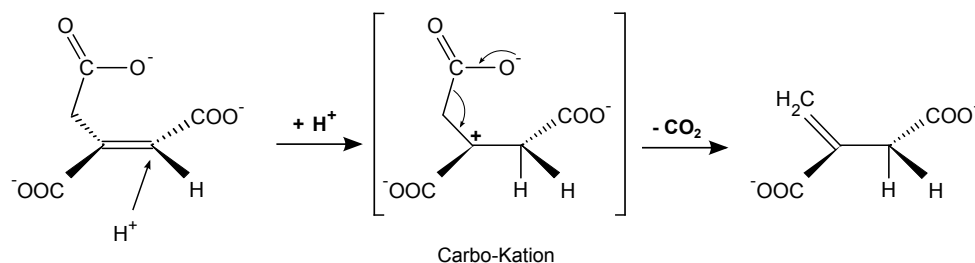
Für Aconitat-*cis-trans*-Isomerasen wurden bereits verschiedene Reaktionsmechanismen diskutiert. So konnten Klinman und Rose 1971 für eine Aconitat-*cis-trans*-Isomerase in *Pseudomonas putida* zeigen, dass dort die Isomerisierung über eine Verschiebung der Doppelbindung erfolgt (Klinman and Rose, 1971). Dieser Reaktionsmechanismus wurde auch für Mii aus *E. barkeri* vermutet (Velarde et al., 2009).

Auf der Sequenzebene weist *U. maydis* Adil die größte Ähnlichkeit zur Oxalo-Mesaconat-Tautomerase GalD aus *P. putida* auf, die die Keto-Enol Tautomerisierung von Oxalo-Mesaconat im Abbauweg der Gallussäure katalysiert (Nogales et al., 2011). Der Reaktionsmechanismus von Keto-Enol Tautomerasen erfolgt mit Hilfe einer Proton-Abstraktion, die zu einem mesomerie-stabilisierten Enolat-Ion führt. Durch die erneute Anlagerung des Protons am Sauerstoffatom der Carbonyl-Gruppe wird dann die Verschiebung der Doppelbindung erreicht.

Aufgrund der Ähnlichkeiten sowohl zur Aconitat-Isomerase aus *P. putida* als auch zu GalD kann man vermuten, dass Adil die Isomerisierung von *cis*-Aconitat zu *trans*-Aconitat im Itaconat-Biosyntheseweg von *U. maydis* durch allylische Umstrukturierung über ein transientes Carbanion katalysiert (Abbildung 3.1).

Die biochemische Charakterisierung der Enzymaktivität von Adil zeigte, dass das Gleichgewicht der katalysierten Reaktion stark auf der Seite von *trans*-Aconitat liegt (88%). Dies wurde in ähnlicher Weise für Aconitat-Isomerasen bereits 1948 durch Ambler und Roberts beobachtet und liegt daran, dass sich die beiden Carboxylgruppen in *trans*-Stellung weniger behindern (Ambler and Roberts, 1948). Unter Bedingungen, die die Produktion von Itaconsäure und damit auch die Expression von Adil induzieren, stellt diese Verteilung einen Vorteil für die Itaconat-Produktion in *U. maydis* dar, da *cis*-Aconitat auch von der Aconitase genutzt wird, während *trans*-Aconitat kein Substrat für dieses Enzym ist und sogar als Inhibitor gilt (Thompson et al., 1990).

Das zweite Enzym im Itaconat-Biosyntheseweg von *U. maydis* Tad1 hat große Ähnlichkeit zur prokaryotischen 3-Carboxy-*cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase (CMLE), die im Abbauweg von aromatischen Verbindungen die Lactonisierung von 3-Carboxy-*cis,cis*-Muconat katalysiert (Ornston and Stanier, 1966b,a). Diese Reaktion erfolgt über eine anti-1,2-Additions-Eliminierung, vergleichbar mit der Reaktion einer Fumarase vom Typ II (Williams et al., 1992).



**Abbildung 3.2: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der *trans*-Aconitat-Decarboxylase Tad1 aus *U. maydis***

Dargestellt ist ein hypothetischer Reaktionsmechanismus von Tad1. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Fumarasen vom Typ II könnte Tad1 die Decarboxylierung von *trans*-Aconitat über eine anti-1,2-Additions-Eliminierung katalysieren. Dabei wird durch Addition eines Protons ein transientes Carbo-Kation erzeugt, anschließend erfolgt die Eliminierung der Carboxylgruppe.

Ein potentieller Reaktionsmechanismus für Tad1 in *U. maydis* wäre daher die Decarboxylierung von *trans*-Aconitat durch Addition eines Protons an das 4. C-Atom unter der Bildung eines transienten Carbo-Kations (Abbildung 3.2). Im Anschluss daran erfolgt die Eliminierung einer Carboxylgruppe. Dieser hypothetische Reaktionsmechanismus könnte über die Zugabe von deuterierten Substraten und anschließender NMR-Spektroskopie oder durch Auflösung der Kristallstruktur von Tad1 überprüft werden. Außerdem sollte die pH-Abhängigkeit der potentiellen Reaktion von Tad1 überprüft werden, da der hier vorgeschlagene Mechanismus mit Bildung eines Carbo-Kations in saurer Umgebung begünstigt wird.

Interessanterweise wurde durch Stammbaum-Analysen festgestellt, dass es auch einige wenige Bakterien gibt, in denen sowohl ein Gen für ein Protein der PrpF-Familie, als auch für eine CMLE vorhanden sind (Daten nicht gezeigt). Im phytopathogenen Bakterium *Dickeya dadantii* sind diese Gene vermutlich sogar in einem Operon organisiert. Dies deutet darauf hin, dass CMLE-ähnliche Proteine vermutlich auch in Bakterien als *trans*-Aconitat-Decarboxylase fungieren können. Möglicherweise ist somit auch *Dickeya dadantii* in der Lage Itaconat zu produzieren.

### 3.1.2 Die Gene für die Itaconsäure Biosynthese sind in einem Gencluster organisiert

Die für die Itaconat-Produktion in *U. maydis* verantwortlichen Gene sind in einem Gencluster organisiert, der alle für den Biosyntheseweg benötigten Gene, sowie einen spezifischen Transkriptionsfaktor enthält. Neben den Genen für die beiden Enzyme Adi1 und Tad1 sind auch Gene für einen mitochondriellen Transporter und einen Plasmamembran-Transporter vorhanden. Zusätzlich finden sich links des Genclusters noch zwei weitere Gene, *cyp3* und *rdo1*, die während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* gemeinsam mit den anderen Genen reguliert werden, aber keine Funktion in der Itaconsäure-Biosynthese haben (Abbildung 2.4).

In *A. terreus*, der für die industrielle Produktion von Itaconat genutzt wird (Willke and Vorlop, 2001), sind die Gene des Itaconat-Biosyntheseweges ebenfalls in einem Gencluster angeordnet, welcher dem von *U. maydis* sehr ähnlich ist. Auch hier sind Gene für einen mitochondriellen (*mttA*) und einen Plasmamembran-Transporter (*mfsA*), sowie für das Hauptenzym *cis*-Aconitat-Decarboxylase (*cadA*) vorhanden, die jedoch auf Proteinebene nur geringe Ähnlichkeit zu den *U. maydis* Proteinen zeigen (Abbildung 3.3).

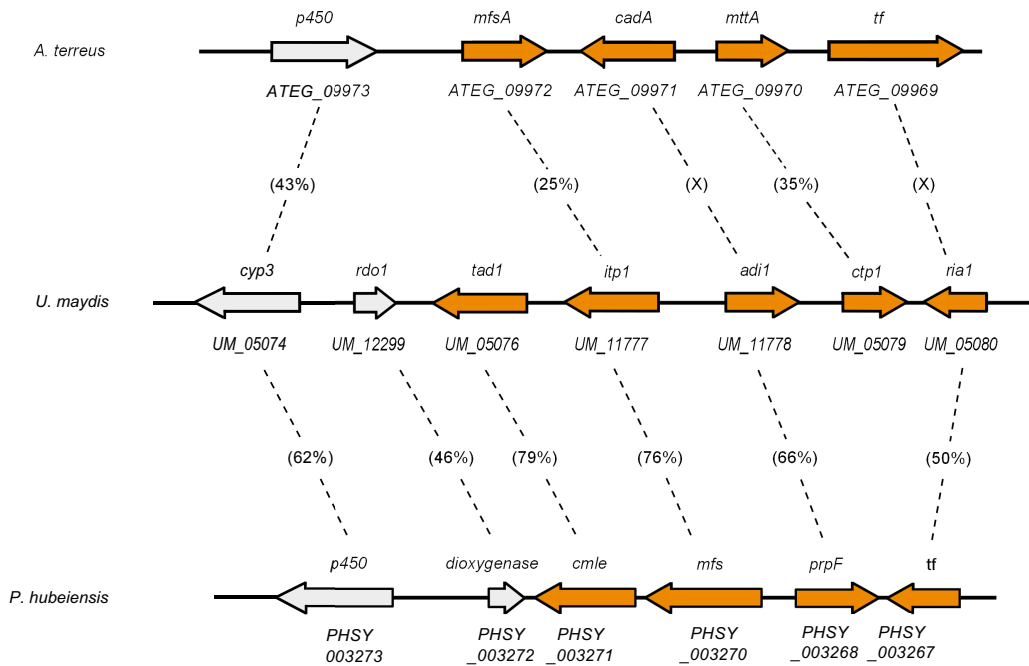
Während in *A. terreus* die Biosynthese der Itaconsäure durch ein einziges Enzym (CadA) katalysiert wird, werden in *U. maydis* zwei enzymatische Aktivitäten benötigt. In beiden Organismen sind die Enzyme vermutlich bakteriellen Ursprungs, wobei CadA zur PrpD und Adi1 zur PrpF-Familie gehört. Propionatabbauende Mikroorganismen besitzen jedoch entweder PrpD- oder AcnD und PrpF-Aktivität. Daraus lässt sich ableiten, dass die entsprechenden Gene nicht aus demselben Bakterium übernommen wurden und die beiden Biosynthesewege für Itaconat somit unabhängig voneinander entstanden sind.

In *Pseudozyma hubeiensis*, der sehr nah mit *U. maydis* verwandt ist, konnte anhand einer Genomanalyse ein *tad1*-ähnliches Gen identifiziert werden.

Bei genauerer Betrachtung der genomischen Umgebung, wurde festgestellt, dass neben einem



Gen für Tad1, auch die Gene für Adi1, Itp1, sowie für einen Transkriptionsfaktor vorhanden sind (Abbildung 3.3). Außerdem sind auch Gene für eine P450-Monooxygenase und eine Ringspaltende Dioxygenase vorhanden, während das Gen für den mitochondriellen Transporter hier jedoch nicht identifiziert werden konnte. Zwischen den jeweiligen in *U. maydis* und *P. hubeiensis* vorhandenen Proteinen besteht eine sehr hohe Ähnlichkeit. Außerdem sind in *P. hubeiensis* beide für die Itaconat-Biosynthese kritischen Enzyme vorhanden. Zwar fehlt in diesem Organismus der mitochondrielle Transporter, es wurde für *U. maydis* aber in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass dieser für die Itaconat-Produktion nicht essentiell ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass *P. hubeiensis* ebenfalls in der Lage ist, Itaconsäure zu produzieren.



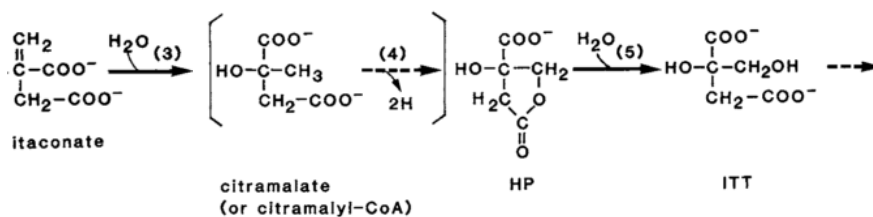
**Abbildung 3.3: Vergleich der Itaconsäure-Gencluster aus *A. terreus*, *U. maydis* und *P. hubeiensis***  
Dargestellt ist die genomische Anordnung der Gene des Itaconsäure-Genclusters in *A. terreus* im direkten Vergleich zu dem entsprechenden Gencluster in *U. maydis* und *P. hubeiensis*. Die Sequenzhomologie auf Aminosäureebene ist in Klammern angegeben (ClustalW).

Charakteristisch für Sekundärmetabolit-Gencluster ist häufig eine gemeinsame Regulation der darin organisierten Gene durch einen spezifischen Transkriptionsfaktor (Keller et al., 2005). So wird der Itaconsäure-Gencluster in *A. terreus* vermutlich auch durch einen Transkriptionsfaktor reguliert, der in direkter Nachbarschaft zu den Genen des Biosyntheseweges liegt (Abbildung 3.3) (Li et al., 2011). Dies wurde für diesen Organismus bisher jedoch noch nicht nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Ria1 die Itaconsäure-Biosynthese in *U. maydis* spezifisch reguliert (Vergleich Abbildung 2.3). Die Expressions-Analyse des Deletionsstammes von *ria1* zeigte, dass *cyp3* und *rdo1* vermutlich nicht von Ria1 reguliert werden und somit nicht direkt zum Itaconsäure Biosynthese-Gencluster gehören. Überraschenderweise zeigte sich auch, dass Tad1 trotz der Deletion von *ria1* immer noch relativ stark exprimiert wird, was auf einen zweiten Regulator hindeutet.

Dadurch kann der ursprünglich angenommene Gencluster in zwei Teile geteilt werden, die sich bei *Tad1* überschneiden.

### 3.1.3 Die Überexpression von Cyp3 führt zu einer Reduktion der Itaconsäure-Produktion

Während in Deletionsstämmen für *adi1*-, *tad1*- und *ria1* keine Itaconsäure-Produktion mehr nachgewiesen werden konnte, führte das Fehlen des Plasmamembran-Transporters und des mitochondrialen Transporters nur zu einer Reduktion der gebildeten Menge an Itaconsäure (Abbildung 2.2). Die Überexpression des für den Itaconat-Gencluster spezifischen Transkriptionsfaktors *Ria1*, sowie des mitochondrialen Transporters *Ctp1* führte dagegen zu einer Verdopplung der Produktionsrate. Auch in *Aspergillus terreus* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des mitochondrialen Transporters *MttA* zu einer Steigerung der Itaconsäure-Produktion führt (van der Straat et al., 2014). Demnach ist vermutlich der Transport von *cis*-Aconitat aus den Mitochondrien ins Zytoplasma in beiden Organismen ein limitierender Schritt des Itaconsäure-Biosyntheseweges.

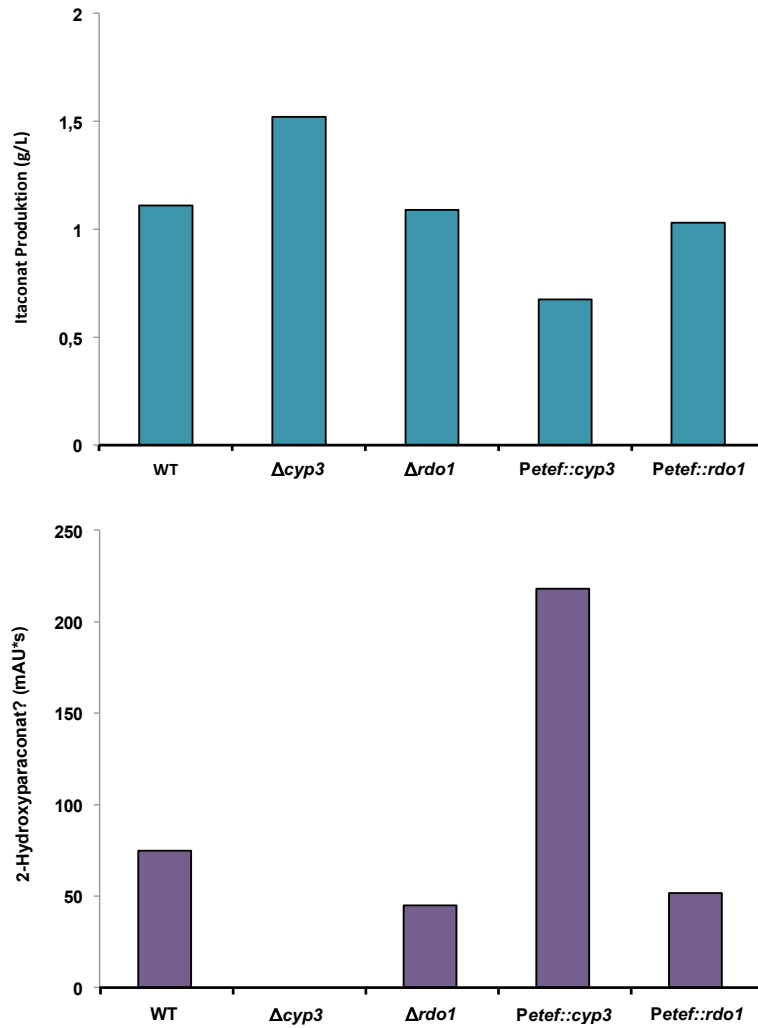


**Abbildung 3.4: Hypothetischer Syntheseweg von Itaconat zu Itatartarat (ITT) in *Ustilago cynodontis***

Dargestellt ist ein möglicher Syntheseweg von Itaconat zu Itatartarat (ITT) in *Ustilago cynodontis*. Die ersten Schritte, die zu 2-Hydroxyparaconat führen, sind hypothetisch. Für die Synthese von Itatartarat aus 2-HP wird vermutlich eine Lactonase benötigt. Verändert übernommen aus (Guevarra and Tabuchi, 1990a).

Die Deletion von *cyp3* und *rdo1* hatte keinen signifikanten Effekt auf die Produktionsrate. Überraschenderweise führte jedoch die Überexpression der P450 Monooxygenase Cyp3, der eigentlich keine Rolle in der Itaconat-Biosynthese zugeordnet wurde, zu einer Verminderung des Itaconsäure-Levels.

In *Aspergillus terreus* wurden neben der Itaconsäure auch andere organische Säuren wie 2-Hydroxyparaconat (2-HP) und Itatartarat (ITT) im Kulturüberstand identifiziert (Jakubowska J, Metodiewa D, 1974; Jakubowska J, 1974). Die Produktion dieser Substanzen wurde auch für *Ustilago*-Spezies schon gezeigt (Stodola et al., 1945; Guevarra and Tabuchi, 1990a). Interessanterweise wurde die Itaconsäure-Konzentration in diesen Kultivierungen mit der Dauer der Inkubation geringer, während die Konzentration von 2-HP zunahm. Daraus wurde ein Biosyntheseweg abgeleitet, in dem die Itaconsäure in zwei Schritten über 2-HP zu ITT verstoffwechselt wird (Abbildung 3.4) (Guevarra and Tabuchi, 1990b).



**Abbildung 3.5: Die Überexpression von *cyp3* führt in *U. maydis* zur Produktion einer noch unbekannten Substanz**

Gezeigt ist die Itaconsäure-Produktion der jeweiligen Stämme im Vergleich zur Produktion von vermutlich 2-Hydroxyparaconat. Während durch Überexpression von *cyp3* das Itaconsäure-Level reduziert wurde, konnte ein Anstieg der Substanz im Medium beobachtet werden. In der Deletionsmutante für *cyp3* konnte diese Verbindung nicht detektiert werden (mAU= milli-arbitrary units).

In den HPLC-Messungen dieser Arbeit wurde in den Itaconat-produzierenden Kulturen eine Substanz detektiert, die ähnliche Elutionseigenschaften wie 2-HP hat (E. Geiser, persönliche Mitteilung). Interessanterweise nimmt die Konzentration dieser Substanz zu, wenn *cyp3* überexprimiert wird, während sie im Überstand einer *cyp3*-Deletionsmutante nicht detektierbar ist (Abbildung 3.5). Es stehen jedoch weder für 2-HP noch für ITT geeignete Standards zur Verfügung, um eine nähere Charakterisierung dieser Substanz vorzunehmen.

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ergaben Untersuchungen der Transkriptlevel, dass die *trans*-Aconitat-Decarboxylase Tad1 vermutlich noch durch mindestens einen zweiten Transkriptionsfaktor reguliert wird. Dies deutet auf eine weitere Funktion von Tad1 hin, die unabhängig von der Itaconat-Biosynthese ist.

Tad1 hat hohe Ähnlichkeit zur prokaryotischen CMLE, die die Lactonisierung von 3-Carboxy-

*cis,cis*-Muconat im Aromaten-Abbauweg von Mikroorganismen katalysiert. Eine erste Hypothese wäre hier daher eine Rolle in einem Itaconat-Abbauweg, der über die Lactonisierung von Itaconat durch Tad1 zu Paraconat und die anschließende Hydroxylierung durch Cyp3 zu 2-Hydroxyparaconat führt (Vergleich 3.4). Diese enzymatische Aktivität für Tad1 konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Auch ein auf Itaconat durchgeführter Wachstumstest ergab keinen weiteren Hinweis auf die Rolle von Cyp3 oder Tad1 in einem möglichen Abbauweg, da kein Phänotyp beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise ist jedoch auch in *A. terreus* und in *P. hubeiensis* ein Gen für eine P450-Monooxygenase in direkter Nachbarschaft zum Itaconsäure-Gencluster lokalisiert, was auf eine mögliche Konservierung dieses potentiellen Abbauweges hindeutet.

Der Abbau von Itaconat ist bereits aus humanpathogenen Bakterien bekannt, die von Makrophagen produziertes Itaconat abbauen. Die Makrophagen bilden Itaconat zur Abwehr von Bakterien, da es die Isocitrat-Lyase inhibiert, die für das Wachstum bakterieller Zellen essentiell ist (Strelko et al., 2011; Michelucci et al., 2013). In *Yersinia pestis* und *Pseudomonas aeruginosa* konnten bereits Gene identifiziert werden, die für Enzyme eines Itaconat-Abbauweges kodieren. Hier handelt es sich jedoch um Enzyme wie eine Itaconat-CoA-Hydratase, eine Itaconat-CoA-Transferase und eine S-citramalyl-CoA-Lyase, die Itaconat zu Pyruvat bzw. Acetyl-CoA degradieren (Sasikaran et al., 2014). Ein Verlust dieses Abbauweges führt dabei zu einer Reduzierung der Pathogenität dieser Bakterien.

## 3.2 Charakterisierung des Adi2-Genclusters

### 3.2.1 Der Adi2-Gencluster ist für die Verstoffwechselung von *cis*- und *trans*-Aconitat essentiell

Durch bioinformatische Untersuchungen konnten neben Adi1 noch zwei weitere Proteine in *U. maydis* identifiziert werden, die eine Ähnlichkeit zu bakteriellen PrpF-Proteinen haben. Während es sich bei *um06058* vermutlich um ein einzelnes Gen handelt, ist *um02807* in einem kleinen Gencluster auf Chromosom 6 organisiert. Dieser Gencluster hat eine gewisse Ähnlichkeit zum Itaconat-Gencluster, da er neben *adi2* auch Gene für einen Plasmamembrantransporter und einen mitochondrialen Transporter enthält. Der Adi2-Gencluster kann aber, im Gegensatz zum Itaconat-Gencluster, auch in verwandten Pilzen wie *Sporisorium reilianum* oder *Pseudomyces antarctica* gefunden werden.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte Um02807 ebenfalls als Aconitat- $\Delta$ -Isomerase Adi2 identifiziert werden, die die Funktion von Adi1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* uneingeschränkt übernehmen kann. Für Um06058 konnte eine solche enzymatische Aktivität nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Im *adi1*-Deletionsstamm ist keine Itaconat-Produktion detektierbar, jedoch kann der Phänotyp durch Überexpression von Adi2 aufgehoben werden (Abbildung 2.14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *adi2* unter Itaconat-Produktionsbedingungen nicht exprimiert wird.

In Wachstumstests, in denen *cis*- bzw. *trans*-Aconitat als Substrat verwendet wurde, wurde beobachtet, dass der potentielle Adi2-Gencluster, für die Verstoffwechselung von Aconitat es-

### 3 Diskussion

sentiell ist. Bereits 1961 konnte gezeigt werden, dass fluoreszierende *Pseudomonas*-Spezies, die *trans*-Aconitat als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können, eine Aconitat-Isomerase besitzen (Rhagavendra Rao and Altekar, 1961).

Die Wachstumstests zeigten, dass eine Deletion von *adi2* bereits auf *trans*-Aconitat mit Glukose zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums führt, was auf eine toxische Wirkung von *trans*-Aconitat auf *U. maydis* hindeutet. Bisher konnte jedoch noch keine toxische Wirkung von *trans*-Aconitat auf Mikroorganismen nachgewiesen werden (Watanabe et al., 1997), obwohl *trans*-Aconitat ein effektiver Inhibitor der Aconitase (Lauble et al., 1994), sowie der Fumarase ist (Rebholz and Northrop, 1994). Es gibt außerdem Studien, dass *trans*-Aconitat z.B. in Gras ein effizienter Antifraßstoff gegen braune Heuschrecken ist (Kim et al., 1976). Auch ist bekannt, dass eine Akkumulation von mehr als 1% *trans*-Aconitat im Futtermittel bei Wiederkäuern das sogenannte Weidefieber auslöst, welches oft tödlich endet (Bohman et al., 1969).

*Trans*-Aconitat ist in großen Mengen in Pflanzenmaterial vorhanden (MacLennan and Beevers, 1964; Burau and Stout, 1965), insbesondere auch in Maispflanzen. Die Deletion der einzelnen Gene des *Adi2*-Genclusters in SG200 hatte aber keinen Effekt auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis*, obwohl die Auswertung von Microarray-Daten ergab, dass der potentielle *Adi2*-Gencluster vor allem im Tumorgewebe hochreguliert ist. Es ist daher davon auszugehen, dass die Konzentration an *trans*-Aconitat im pflanzlichen Gewebe zu gering ist, um die Deletionsmutanten zu beeinträchtigen.

Zusammengefasst deuten die Daten außerdem darauf hin, dass die Fähigkeit, *trans*-Aconitat zu verstoffwechseln zwar von Vorteil, aber für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* nicht essentiell ist, weil vermutlich noch andere Kohlenstoffquellen in der Pflanze zur Verfügung stehen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Bakterien- und Hefestämme

#### 4.1.1 *E.coli*-Stämme

Für Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Invitrogen) verwendet.

Stamm	Genotyp	Referenz
Rosetta (DE3)	F-ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal <sub>dc</sub> m (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Merck-Millipore
Top10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen

#### 4.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
ESM356	MATa, ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63	(Pereira et al., 2001)

#### 4.1.3 *Ustilago maydis*-Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
MB215	<i>a2 b13</i>	/	Laborsammlung
SG200	<i>a1 mfa2 bW2/bE1</i>	Phleomycin	(Kämper et al., 2006)
MB215 Δ <i>um11778</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	Laborsammlung
MB215 Δ <i>um02807</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	Laborsammlung
MB215 Δ <i>um06058</i>	<i>a2 b13</i>	Hygromycin	Laborsammlung
MB215 Δ <i>um11778</i> Petef::GFP-Um11778	<i>a2 b13</i>	Hygromycin, Cbx	Laborsammlung

## 4.2 Plasmide und Primer

### 4.2.1 Standard-Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pJet1.2	Amp	Fermentas
pGEX4T-1	Amp	GE Healthcare
pRS426	Amp, Ura3 ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Sikorski and Hieter, 1989)
pETEF-GFP-Ala6-MMXN	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Laborsammlung
pCRG-GFP-Ala6-MXN	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Laborsammlung
pMF-1H	Amp, Hyg ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pMF-1N	Amp, Nat ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pET15b	Amp	EMD Millipore
pGREG503	Amp, His ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Jansen et al., 2005)
pGREG504	Amp, Trp ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Jansen et al., 2005)
pGREG505	Amp, Leu ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Jansen et al., 2005)
pGREG506	Amp, Ura ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Jansen et al., 2005)
pGREG576	Amp, Ura ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Jansen et al., 2005)

## 4.3 In dieser Arbeit erstellte Stämme

### 4.3.1 *Ustilago maydis*-Stämme

Stamm	Genutze Plasmide	Resistenz	Ausgangsstamm
MB215 $\Delta$ um05074	pRS426-05074-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um12299	pRS426-12299-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um05076	pRS426-05076-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um11777	pRS426-11777-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um05079	pRS426-05079-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um05080	pRS426-05080-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um10608	pRS426-10608-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um02806	pRS426-02806-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um02808	pRS426-02808-Hyg	Hyg <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um02807 $\Delta$ um11778	pRS426-11778-Nat	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um02807
SG200 $\Delta$ um05074	pRS426-05074-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um12299	pRS426-12299-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um05076	pRS426-05076-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um11777	pRS426-11777-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um11778	pRS426-11778-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um05079	pRS426-05079-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um05080	pRS426-05080-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um10608	pRS426-10608-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um02806	pRS426-02806-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200

## 4 Material und Methoden

Stamm	Genutze Plasmide	Resistenz	Ausgangsstamm
SG200 $\Delta$ um02807	pRS426-02807-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 $\Delta$ um02808	pRS426-02808-Hyg	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
MB215 $\Delta$ um05076 Petef::GFP-05076	pETEF-GFP-05076	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05076
MB215 $\Delta$ um11777 Petef::GFP-11777	pETEF-GFP-11777	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11777
MB215 $\Delta$ um05079 Petef::GFP-05079	pETEF-GFP-05079	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05079
MB215 $\Delta$ um10608 Petef::10608-GFP	pETEF-10608-GFP	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um10608
MB215 $\Delta$ um02806 Petef::02806-GFP	pETEF-02806-GFP	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um02806
MB215 $\Delta$ um02807 Petef::GFP-02807	pETEF-GFP-02807	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um02807
MB215 Petef::05074	pETEF-05074	Cbx <sup>R</sup>	MB215
MB215 Petef::12299	pETEF-12299	Cbx <sup>R</sup>	MB215
MB215 Petef::05076	pETEF-05076	Cbx <sup>R</sup>	MB215
MB215 Petef::11778	pETEF-11778	Cbx <sup>R</sup>	MB215
MB215 Petef::05079	pETEF-05079	Cbx <sup>R</sup>	MB215
MB215 Petef::05080	pETEF-05080	Cbx <sup>R</sup>	MB215
MB215 $\Delta$ um05074 Petef::05074	pETEF-05074	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05074
MB215 $\Delta$ um12299 Petef::12299	pETEF-12299	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um12299
MB215 $\Delta$ um05076 Petef::05076	pETEF-05076	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05076
MB215 $\Delta$ um11777 Petef::11777	pETEF-11777	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11777
MB215 $\Delta$ um11778 Petef::11778	pETEF-11778	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11778
MB215 $\Delta$ um05079 Petef::05079	pETEF-05079	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05079
MB215 $\Delta$ um05080 Petef::05080	pETEF-05080	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05080
MB215 $\Delta$ um05074 P05074::05074	p05074-05074-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05074
MB215 $\Delta$ um12299 P12299::12299	p12299-12299-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um12299
MB215 $\Delta$ um05076 P05076::05076	p05076-05076-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05076
MB215 $\Delta$ um11777 P11777::11777	p11777-11777-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11777
MB215 $\Delta$ um11778 P11778::11778	p11778-11778-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11778
MB215 $\Delta$ um05079 P05079::05079	p05079-05079-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05079
MB215 $\Delta$ um05080 P05080::05080	p05080-05080-Cbx	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05080
MB215 $\Delta$ um11778 Petef::02807	pETEF-02807	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11778
MB215 $\Delta$ um11777 Petef::10608	pETEF-10608	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um11777
MB215 $\Delta$ um05079 Petef::02806	pETEF-02806	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05079
MB215 $\Delta$ um05080 Petef::02808	pETEF-02808	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um05080
MB215 $\Delta$ um02808 Petef::05080	pETEF-05080	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	MB215 $\Delta$ um02808
MB215 Pcrgr::05080	pCRG-05080	Cbx <sup>R</sup>	MB215

### 4.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genutze Plasmide	Resistenz
ESM356 Pgal::um05076	pGREG503-um05076	His <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::um11778	pGREG506-um11778	Ura <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::um05079	pGREG504-um05079	Trp <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::um11777	pGREG505-um11777	Leu <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::um05076, Pgal::um11778	pGREG503-um05076, pGREG506-um11778	His <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::um05076, Pgal::um11778, Pgal::um05079	pGREG503-um05076, pGREG506-um11778, pGREG504-um05079	His <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup>



Stamm	Genutzte Plasmide	Resistenz
ESM356 Pgal::um05076, Pgal::um11778, Pgal::um11777	pGREG503-um05076, pGREG506-um11778, pGREG504-um11777	His <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::um05076, Pgal::um11778, Pgal::um05079, Pgal::um11777	pGREG503-um05076, pGREG506-um11778, pGREG504-um05079, pGREG505-um11777	His <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , Leu <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::GFP-um05076	pGREG576-um05076	Ura <sup>+</sup>
ESM356 Pgal::GFP-um11778	pGREG576-um11778	Ura <sup>+</sup>

### 4.3.3 Plasmide für die Transformation von *U. maydis*

#### pRS426-05076-Hyg

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um05076* (*tad1*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um05076* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG83 LF 05076 fwd	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattacatacgt-gatgccaatacatttcc
MG84 LF 05076 rev	gcggccgcaattgtcacgccatggtggccatctaggc-cactggatcgacgtaaaagccagccgg

Primer rechte Flanke:

MG85 RF 05076 fwd	gcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggcc-tacgtgtaccttgttggcctccctcg
MG86 RF 05076 rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgactttta-cacgcgcctcggc

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG83 und MG84, der rechten Flanke mit den Primer MG85 und MG86. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### pRS426-11777-Hyg

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um11777* (*itp1*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um11777* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG87 LF 11777 fwd	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattccccatttt- cacgtttgttac
MG88 LF 11777 rev	gcggccgcaattgtcagccatggtggccatctaggccttc- gacttggtggatactgcggc

Primer rechte Flanke:

MG89 RF 11777 fwd	gcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggcctagca- gagacgatggccaccttgagg
MG90 RF 11777 rev	cgcagacaaggaagcgtcgtacaatattgctgtttcctgtgt- gaaattgttatccgc

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG87 und MG88, der rechten Flanke mit den Primern MG89 und MG90. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### pRS426-05079-Hyg

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um05079* (*ctp1*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um05079* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG91 LF 05079 fwd	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatatttcgatcgag- catccgagcggcg
MG92 LF 05079 rev	gcggccgcaattgtcagccatggtggccatctaggc- cgggtgatgacgaatctcaagagcg

Primer rechte Flanke:

MG93 RF 05079 fwd	gcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggcct- tagctgtgccccctcgctgtttcc
MG94 RF 05079 rev (3' <i>SspI</i> ) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattctgctc- cagcaggcgtgcgacg

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG91 und MG92, der rechten Flanke mit den Primern MG93 und MG94. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### pRS426-05080-Hyg

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um05080* (*ria1*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um05080* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG95 LF 05080 fwd	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattgttgactg- cggactgcggactgc
MG96 LF 05080 rev	gcggccgcaattgtcacgccatggtggccatctaggccgttgg- caggacgctcgtcgtcgc

Primer rechte Flanke:

MG97 RF 05080 fwd	gcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggcccgtgt- caagtcgaatccgtgattctc
MG98 RF 05080 rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgtccaactc- gagcaactaccttgccgg

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG95 und MG96, der rechten Flanke mit den Primern MG97 und MG98. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### pRS426-05074-Hyg

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um05074* (*cyp3*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um05074* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG340 LF 05074 fwd	gtaacgccagggttttccccagtcacgacgaatattccacc- cgcttggcagctccagttgg
MG341 LF 05074 rev	ccgcaattgtcacgccatggtggccatctaggcctgcgacata- caaca

Primer rechte Flanke:

MG342 RF 05074 fwd	gcggccgcaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggcct- cgctcgcctctccgctcgtg
MG342 RF 05074 rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattccgcaacg- cagtcgtaacacgatcttg

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG340 und MG341, der rechten Flanke mit den Primern MG342 und MG343. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### **pRS426-12299-Hyg**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um12299* (*rdo1*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um12299* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG344 LF 12299 fwd	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattgatgtctgc-gatctccgggcag
MG345 LF 12299 rev	cgagtgcggccgcaattgtcacgccatggtggccatctaggc-cgtgtggtggtctgtgaatcaagtcgtg

Primer rechte Flanke:

MG346 RF 12299 fwd	ccgcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggc-cacgtccaacaaatctcctgagttcagc
MG347 RF 12299 rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgcgtggc-cacggaacacgaccgc

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG344 und MG345, der rechten Flanke mit den Primern MG346 und MG347. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### **pRS426-10608-Hyg**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um10608*. Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um10608* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

41 LF fwd 10608	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattgaggacac-gactctcgtggccgcccgc
42 LF rev 10608	cgagtgcggccgcaattgtcacgccatggtggccatctaggc-cggttcgagcctttgtgttctaggagtgg

Primer rechte Flanke:

43 RF fwd 10608	ccgcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggc-cagcacacaagctcgattcacgaatc
44 RF rev 10608	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattcgag-gaaggtgtctccttgacgtgc

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern 41 und 42, der rechten Flanke mit den Primern 43 und 44. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### **pRS426-02806-Hyg**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um02806*. Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um02806* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG332 LF fwd 02806	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattggtcgaaag-cctttggcgaaagggg
MG333 LF rev 02806	gagtgcggccgcaattgtcagccatggtggccatctaggccgg-cgaatcgtggttcttgggac

Primer rechte Flanke:

MG334 RF fwd 02806	gccgcgaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggccgg-gaactatctacttgcacacgc
MG335 RF rev 02806	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgatgagac-cctgcgcggaaacg

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern MG332 und MG333, der rechten Flanke mit den Primern MG334 und MG335. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### **pRS426-02808-Hyg**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um02808*. Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um02808* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

49 LF fwd 02808	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatattaccgtgc-gaaggagcgcgacg
50 LF rev 02808	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgaaggtg-cccaccgaatcacgac

Primer rechte Flanke:

51 RF fwd 02808	gagtgcggccgcaattgtcagccatggtggccatctaggccgg-cgggtgacgcacaccggtcg
52 RF rev 02808	cggcggaagctgtgcggccgcattaataggcctgagtggc-cggtaccaacacaaactgcgcttcagc

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern 49 und 50, der rechten Flanke mit den Primern 51 und 52. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-h in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### **pRS426-11778-Nat**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Deletionsmutante von *um11778* (*adi1*). Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *um11778* gegen eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

45 LF fwd 11778 gtaacgccagggttttccagtcacgacgaataataacttgc-  
gaagcttcggcgactagaggc

46 LF rev 11778 aggtgcccgcgaattgtcacgccatggtggccatctaggc-  
cggtgagctgggtcgagtcaagaccgac

Primer rechte Flanke:

47 RF fwd 11778 gcaagctgtaggagtgccggccgattaataggcctgagtgg-  
ccttgctgtaatagaaacccacacccacag

48 RF rev 11778 gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattcggttcg-  
gctcttggtcagatcg

Amplifikation der linken Flanke erfolgte mit den Primern 45 und 46, der rechten Flanke mit den Primern 47 und 48. Klonierung der Flanken zusammen mit der Hyg-Kassette aus pMF1-n in pRS426 per Hefe Drag and Drop-System. Ausschneiden des Konstruktes mit *SspI* und Transformation von *U. maydis* Protoplasten.

### **pETEF-um05074-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um05074* (*cyp3*).

#### Konstruktion

1 05074 fwd *XmaI* gtacccgggatgaacacgaccaaactactcggtagcg

2 05074 rev *NotI* ctagcgccgcctattgtttgtgagcacgggggaaag

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 1 und 2 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *XmaI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den *Sdh2*-Locus (*ip*-Locus).

### **pETEF-um12299-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um12299* (*rdo1*).

#### Konstruktion

3 12299 fwd *XmaI* gtacccgggatgaacacgaccaaactactcggtagcg

4 12299 rev *NotI* ctagcgccgcctattgtttgtgagcacgggggaaag

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 3 und 4 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *XmaI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den *Sdh2*-Locus (*ip*-Locus).

### **pETEF-um05076-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um05076* (*tad1*).

#### Konstruktion

5 05076 fwd BamHI

gtcggatccatggcacctgcactcaacgcaaaccctacc

MG210 05076 rev NotI

cgggcgccgctcaggccgacgatggcgagacagc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 5 und MG210 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um11777-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um11777* (*itp1*).

#### Konstruktion

6 11777 fwd BamHI

gtcggatccatggaccaagccgatcattccggcg

MG223 11777 rev NotI

cgggcgccgctcagcagtggttgcgagctgcccac

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 6 und MG223 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um11778-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um11778* (*adi1*).

#### Konstruktion

7 5'11778 BamHI

ggtcggatccatgttgcatccgatcgataccacc

8 3'11778 NotI

cgggcgccgcctaagagaggctgcggtcggatgc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 7 und 8 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um05079-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um05079* (*ctp1*).

#### Konstruktion

9 5'05079 BamHI

gtcggatccatgccgcgtctggccgtaaagtgtcg

MG208 3'05079 NotI

cgggcgccgcctacgactcgggacctgctaggagccag

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 9 und MG208 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um05080-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um05080* (*ria1*).

#### Konstruktion

10 5'05080 BamHI	atcggatccatgcgctttgcagggatgagttgcg
11 3'05080 NotI	tcagcgccgcttatcggtgacgtttcttggacctgg

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 10 und 11 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pCRG-um05080-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer induzierbaren Überexpression von *um05080* (*ria1*).

#### Konstruktion

10 5'05080 BamHI	atcggatccatgcgctttgcagggatgagttgcg
11 3'05080 NotI	tcagcgccgcttatcggtgacgtttcttggacctgg

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 10 und 11 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pCRG-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um10608-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um10608*.

#### Konstruktion

37 10608 NotI rev	cggcgccgcccctacgatcgagtctcgagcctgagc
38 10608 XmaI fwd	tccccgggatgggccaacagcaggatccggttaag

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 37 und 38 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Xma*I und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um02806-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um02806*.

#### Konstruktion

35 02806 NotI rev	cggcgccgcccctaagcaactgtggtcgggttgagc
36 02806 BamHI fwd	acgggatccatgtcgacaacagagaaacgaatc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 35 und 36 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).



### **pETEF-um02807-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um02807*.

#### Konstruktion

55 02807 BamHI fwd	ggatccatgttgctccagcctacctcgagc
MG271 02807 NotI rev	cgggcggccgcctactggctaggcgagaggtaatac

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 55 und MG271 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um02808-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer Überexpression von *um02808*.

#### Konstruktion

33 02808 fwd NcoI	atcccatggatgaggtggaaacaagtacacgctgtacc
34 02808 rev NotI	tgccgcccgcctcatagcgagagggcgaggggtgcatc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 33 und 34 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Nco*I und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-GFP-um05076-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion von *um05076*, um die Lokalisierung des Proteins zu ermitteln.

#### Konstruktion

MG211 05076 MscI	gcgtggccacgatggcacctgcaactcaacgc
MG210 05076 rev NotI	cgggcggccgcctcaggccgacgatggcgagacagc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG211 und MG210 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Msc*I und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-GFP-um11777-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion von *um11777*, um die Lokalisierung des Proteins zu ermitteln.

#### Konstruktion

MG222 11777 MluI	gtaacgcgttatggaccaagccgatcattccg
MG223 11777 rev NotI	cgggcggccgcctcagcagtggttgcgagctgcccac

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG222 und MG223 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Mlu*I und *Not*I geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *Ssp*I linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-GFP-um05079-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion von *um05079*, um die Lokalisierung des Proteins zu ermitteln.

#### Konstruktion

MG209 05079 MluI cgcaecgcgtcatgccgccgtctggccg

MG208 3'05079 NotI cgggcggccgcctacgactcgggacctgctaggagccag

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG209 und MG208 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *MluI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um10608-GFP-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer C-terminalen GFP-Fusion von *um10608*, um die Lokalisierung des Proteins zu ermitteln.

#### Konstruktion

40 10608 XmaI rev cagccccgggcatcgagctctcgagcctgagctggg

38 10608 XmaI fwd tccccgggcatgggccaacagcaggatccgtaag

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 40 und 38 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *XmaI* und *XmaI* geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-um02806-GFP-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer C-terminalen GFP-Fusion von *um02806*, um die Lokalisierung des Proteins zu ermitteln.

#### Konstruktion

39 02806 XmaI rev cagccccgggagcaactgtggtcgggttgagcc

36 02806 BamHI fwd acgggatccatgtcgacaacagagaaacgaatc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 39 und 36 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *BamHI* und *XmaI* geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den Sdh2-Locus (ip-Locus).

### **pETEF-GFP-um02807-Cbx**

Dieses Plasmid diente zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion von *um02807*, um die Lokalisierung des Proteins zu ermitteln.

#### Konstruktion

MG270 02807 MscI fwd gcgtggccaggatgttgctccagcctacctcgag

MG271 02807 NotI rev cgggcggccgcctactggctaggcgagaggaataac

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG270 und MG271 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *MscI* und *NotI* geschnitten und in pETEF-GFP-Ala6-MXN-Cbx kloniert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Integration erfolgte über homologe Rekombination in den *Sdh2*-Locus (*ip*-Locus).

### **pGEX4T-1-um05076**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um05076* als GST-Fusionsprotein in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG435 pGEX 05076 BamHI

cgtggatccatggcacctgcactcaacgcaaac

MG436 pGEX 05076 EcoRI

cgggaattctcaggccgacgatgggcgagacagc

Der ORF von *um05076* wurde mittels PCR amplifiziert und über *BamHI* und *EcoRII* in den Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-um11778 ( $\Delta$ Intron)**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um11778* als GST-Fusionsprotein in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

12 pGEX 11778 BamHI

cagggatccatgttgcatccgatcgatacc

MG61 pGEX 11778 EcoRI

tcggaattcctaagagagctgcggtcgg

Der ORF von *um11778* wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde als Template cDNA benutzt, um eine Intron-freie Version von *um11778* zu erhalten. Das Fragment wurde über *BamHI* und *EcoRII* in den Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-um06058**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um06058* als GST-Fusionsprotein in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG58 pGEX 06058 EcoRI fwd

caggaattcgatgctgccaacgtcgatcgtagc

MG59 pGEX 06058 EcoRI rev

ctggaattcctaggacgagatcatggagaggggc

Der ORF von *um06058* wurde mittels PCR amplifiziert und über *EcoRI* und *EcoRII* in den Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pET15b-um02807**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um02807* als 6xHIS-Fusionsprotein in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

### Konstruktion

MG57 pET15b 02807 BamHI

cagggatccgatgttgctccagcctacctcgagccg

MG60 pET15b 02807 EcoRI

ctggaattcctactggctaggcgagagg

Der ORF von *02807* wurde mittels PCR amplifiziert und über *BamHI* und *EcoRII* in den Vektor pET15b ligiert.

### **pGREG503-um05076**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um05076* in *S. cerevisiae*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *Gal4*-Promotors, der durch Galaktose reguliert werden kann.

### Konstruktion

MG398 05076 fwd

gaattcgatatcaagcttatcgataccgctgacaatggcacctg-  
cactcaacgcaaacc

MG399 05076 rev

gcgtgacataactaattacatgactcgaggctgactcaggcc-  
gacgatggcgagacagc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG398 und MG399 amplifiziert. Die Klonierung erfolgte per Hefe Drag and Drop-Methode in den Vektor pGREG503.

### **pGREG506-um11778**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um11778* in *S. cerevisiae*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *Gal4*-Promotors, der durch Galaktose reguliert werden kann.

### Konstruktion

MG392 11778 fwd

gaattcgatatcaagcttatcgataccgctgacaatgttgcaccc-  
gatcgatacc

MG393 11778 rev

gcgtgacataactaattacatgactcgaggctgacctaaga-  
gaggctgcggtcgatgacg

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG392 und MG393 amplifiziert. Als Template-DNA wurde dabei cDNA verwendet, um eine Intron-freie Version von *um11778* zu erhalten. Die Klonierung erfolgte per Hefe Drag and Drop-Methode in den Vektor pGREG506.

### **pGREG504-um05079**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um05079* in *S. cerevisiae*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *Gal4*-Promotors, der durch Galaktose reguliert werden kann.

### Konstruktion

15 pGREG504-CTP1 fwd

gaattcgatatcaagcttatcgataccgctgacaatggcacctg-  
cactcaacgcaaacc

16 pGREG504-CTP1 rev NheI

gcgtgacataactaattacatgactcgaggctgactcaggcc-  
gacgatggcgagacagc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 15 und 16 amplifiziert. Als Template-DNA wurde dabei cDNA verwendet, um eine Intron-freie Version von *um05079* zu erhalten. Das Fragment wurde über *NotI* und *NheI* in den Vektor pGREG504 ligiert.

### **pGREG505-um11777**

Dieses Plasmid dient zur Expression von *um11777* in *S. cerevisiae*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *Gal4*-Pomoters, der durch Galaktose reguliert werden kann.

#### Konstruktion

13 pGREG505-MFS fwd agagcggccgcatggaccaagccgatcattccgg

14 pGREG505-MFS rev tctgctagctcacgagtgtttgcgagctgccc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar 13 und 14 amplifiziert. Als Template-DNA wurde dabei cDNA verwendet, um eine Intron-freie Version von *um11777* zu erhalten. Das Fragment wurde über *NotI* und *NheI* in den Vektor pGREG505 ligiert.

### **pGREG576-um05076**

Dieses Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion von *um05076* in *S. cerevisiae*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *Gal4*-Pomoters, der durch Galaktose reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG398 05076 fwd gaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgacaatggcacctg-  
cactcaacgcaaaccc

MG399 05076 rev gcgtgacataactaattacatgactcgaggctgactcaggcc-  
gacgatggcgagacagc

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG398 und MG399 amplifiziert. Die Klonierung erfolgte per Hefe Drag and Drop-Methode in den Vektor pGREG576.

### **pGREG576-um11778**

Dieses Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion von *um11778* in *S. cerevisiae*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *Gal4*-Pomoters, der durch Galaktose reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG392 11778 fwd gaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgacaatgttgcaccc-  
gatcgatacc

MG393 11778 rev gcgtgacataactaattacatgactcgaggctgacctaaga-  
gaggctgcggtcggatgcg

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MG392 und MG393 amplifiziert. Als Template-DNA wurde dabei cDNA verwendet, um eine Intron-freie Version von *um11778* zu erhalten. Die Klonierung erfolgte per Hefe Drag and Drop-Methode in den Vektor pGREG576.

#### 4.3.4 Allgemeine Materialien

Material	Bezugsquelle
Blottingpapier	Roth (Karlsruhe)
Cryo-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Nylon-Membran	Roth (Karlsruhe)
Petrischalen	Greiner, Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen	Biozym, Sarstedt (Nümbrecht)
PVDF-Membran	Roth (Karlsruhe)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
Sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
0,1 ml Mikroeingang (28 x 5 mm) mit Polymerfuß	VWR
Silikon Schraubkappen	VWR
1,5 ml KGW-Flasche	VWR
96-Well Mikrotiterplatte, steril	Greiner

#### 4.3.5 Kits

Name des Kits	Bezugsquelle
ZR Plasmid Miniprep-Classic	Zymo Research
Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Geneaid
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
Maxima SYBR-Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific

#### 4.3.6 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamidmix (40:2)	Roth (Karlsruhe)
Adenin	Sigma (Deisenhofen)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Alanin	Serva (Heidelberg)
para-Aminobenzoessäure	Sigma Aldrich
ε-Aminocaproensäure	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)

Chemikalien	Bezugsquelle
Arabinose	Merck (Darmstadt)
Arginin	Sigma (Deisenhofen)
Asparagin	Sigma (Deisenhofen)
Asparaginsäure	Serva (Heidelberg)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, US)
Biotin	Sigma Aldrich
Borsäure	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calciumpanthotenat	Sigma Aldrich
Calcofluor	Sigma (Deisenhofen)
Carboxin	Riedle-de Haen (Seelze)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
<i>cis</i> -Aconitsäure	Sigma-Aldrich
Citrat	Sigma-Aldrich
Cobalt(II)chlorid	Merck (Darmstadt)
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Hartmann Analytic
Cycloheximid	Roth (Karlsruhe)
DEPC	(Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNT-Ps)	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisen(II)-Sulfat	Roth (Karlsruhe)
Eisen(III)-Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylacetat	Roth (Karlsruhe)
Galaktose	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Gluthation-Sepharose <sup>TM</sup> 4B	Amersham GE Healthcare
Gluthation-Agarose	Macherey und Nagel (Düren)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
Heringssperma-DNA	Sigma (Deisenhofen)
Histidin	Merck (Darmstadt)

**Chemikalien**

Hygromycin  
 Isocitrat  
 Isoleucin  
 Isopropanol  
 Itaconsäure  
 Kaliumacetat  
 Kaliumchlorid  
 Kaliumdihydrogenphosphat  
 Kaliumiodid  
 Kaliumnitrat  
 Kobaldchlorid  
 Kupferchlorid  
 Kupfersulfat  
 L-Gluthation reduziert  
 L-Histidin  
 Lithiumacetat  
 L-Leucin  
 Lysin  
 Manganchlorid  
 Magnesiumchlorid  
 Magnesiumsulfat  
 MES-Pufferan  
 Methanol  
 Methionin  
 Molybdänsäure  
 Myo-Inositol  
 clonNAT  
 Natriumacetat  
 Natriumchlorid  
 Natriumcitrat  
 Natriumdodecylsulfat (SDS)  
 Natriumdihydrogenphosphat  
 Natriumhydroxid  
 Natriumsulfat  
 Nickelchlorid  
 Nicotinsäure  
 Nutrient Broth  
 Orange G  
 Pepton  
 Phenol  
 Phenylalanin

**Bezugsquelle**

Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)  
 Sigma-Aldrich  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma-Aldrich  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Sigma-Aldrich  
 Werner BioAgents (Jena)  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Sigma Aldrich  
 Difco  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Difco  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)



### Chemikalien

PMFS  
Polyethylenglycol (PEG 3350)  
Potato Dextrose Broth  
Prolin  
Protease Inhibitor Cocktail  
Pyridoxol-Hydrochlorid  
Rubidiumchlorid  
Salzsäure  
Schwefelsäure  
Serin  
Sorbitol  
Stickstoff, flüssig  
TEMED  
Thiamin-Hydrochlorid  
Threonin  
Tris  
Triton X-100  
TRIzol  
Trypton  
Tryptophan  
Tween 20  
Tyrosin  
Valin  
Yeast Nitrogen Base  
Zinkchlorid  
Zinksulfat

### Bezugsquelle

Sigma Aldrich  
Merck (Darmstadt)  
Difco  
Serva (Heidelberg)  
Sigma (Deisenhofen)  
Sigma-Aldrich  
Sigma (Deisenhofen)  
Roth (Karlsruhe)  
Merck (Darmstadt)  
Roth (Karlsruhe)  
Sigma (Deisenhofen)  
MPI Marburg  
Roth (Karlsruhe)  
Sigma Aldrich  
Sigma (Deisenhofen)  
Roth (Karlsruhe)  
Sigma (Deisenhofen)  
Life Technologies  
GibcoBRL Life Technologies  
Merck (Darmstadt)  
Roth (Karlsruhe)  
Sigma (Deisenhofen)  
Merck (Darmstadt)  
Difco  
Merck (Darmstadt)  
Merck (Darmstadt)

### 4.3.7 Enzyme

#### Name des Enzyms

Lysozym  
Lysing Enzyme (T. harzianum)  
Phusion-DNA-Polymerase  
Restriktionsendonukleasen  
  
RNaseA  
DNase  
Shrimp Alkalische Phosphatase  
Calf Intestinal-Phosphatase (CIP)  
T4-DNA-Ligase

#### Bezugsquelle

Boehringer Mannheim (Mannheim)  
Sigma Aldrich  
Laborpräparation  
Thermo-Scientific, New England Biolabs  
(Schwalbach)  
Serva (Heidelberg)  
Amersham  
Thermo-Scientific  
New England Biolabs (Schwalbach)  
Roche

## 4.4 Puffer und Lösungen (Angaben für jeweils 1 Liter)

### 4.4.1 Antibiotika

#### Antibiotika

Amp-Stammlösung:	100 mg/ml
Gentamycin-Stammlösung:	20 mg/ml
Cbx-Stammlösung:	2 mg/ml in Methanol
Hyg-Stammlösung:	426 mg/ml
Nat-Stammlösung:	200 mg/ml
Chloramphenicol-Stammlösung:	25 mg/ml
Genitacin-Stammlösung:	200 mg/ml

### 4.4.2 Lösungen für die Plasmidpräparation mittels "kochender Lyse"

#### Destroyer Lysis-Puffer

10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0
50% (w/v) Saccharose
2 mg/ml Lysozym
100 µg/ml BSA
200 µg/ml RNase A

### 4.4.3 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

#### TAE-Laufpuffer

40 mM Tris/HCl pH 8,3
20 mM Natriumacetat
2 mM EDTA

#### 4.4.4 Southern Blot-Puffer

##### Depurinierungs-Lösung

0,25 M HCl

##### Transfer-Lösung

0,4 M NaOH

##### Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) SDS

500 mM Natriumphosphat Puffer  
pH7,0

##### Waschpuffer

1 % (w/v) SDS

100 mM Natriumphosphat Puffer  
pH7,0

#### 4.4.5 Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

##### 3x Protein-Auftragspuffer

400 mM Tris/HCl pH6,8

30 mM DTT

6 % (w/v) SDS

40 % (v/v) Glycerin

0,006 % (w/v) Bromphenolblau

##### SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer nach Laemmli

25 mM Tris/HCl pH8,8

200 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

##### Proteingel-Färbelösung

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant  
Blue R-250

20 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

##### Entfärbelösung für Proteingele

20 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

**APS-Stammlösung**

10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat

**SDS-Stammlösung**

10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

**TBS**

50 mM Tris/HCl pH7,5  
150 mM NaCl

**Western Blot-Transferpuffer**

25 mM Tris  
192mM Glycin  
0,02 % SDS  
20 % Methanol

**TBS-T**

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

**TBS-T / Milchpulver**

TBST mit 3 % (w/v) Trockenmilch

**4.4.6 Lösungen für die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen**

**CCMB80-Puffer**

10 mM KOAc pH 7,0 (10 ml einer  
1M Stammlösung /l)  
80 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (11,8 g/L)  
20 mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (4,0 g/L)  
10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (2,0 g/L)  
10 % Glycerin (100 ml/L)  
Auf pH 6,4 mit 0,1 M HCl einstellen

#### 4.4.7 Präparation chromosomaler DNA von *U. maydis*

##### Präparation chromosomaler DNA

Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (w/v) SDS 2 % (w/v) Triton X-100
Phenol/Chloroform:	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) Chloroform

#### 4.4.8 Lösungen für die Protoplasierung und Transformation von *U. maydis*

##### SCS-Puffer

20 mM Natriumcitrat-Puffer pH5,8  
1 M Sorbitol

##### SCS-Lysing Enzyme-Lösung

20 mg/ml Lysing Enzyme in SCS

##### STC-Puffer

10 mM Tris/HCl pH7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol

##### STC/PEG

40 % (w/v) Polyethylenglycol in  
STC

#### 4.4.9 Puffer für die Aufreinigung von Proteinen

Alle Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt.

##### Lysepuffer/Waschpuffer

50 mM Tris pH 7,5  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT  
Complete Proteaseinhibitor ohne  
EDTA (Roche)  
0,1 mM PMSF

**GST-Elutionspuffer**

100 mM Tris pH 9.0  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM reduziertes Glutathion  
2,5 mM beta-Mercaptoethanol

**Assay-Puffer**

50 mM Tris pH 7,5  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT  
Complete Proteaseinhibitor ohne  
EDTA (Roche)  
5mM Substrat

**4.4.10 Lösungen zur Herstellung kompetenter Hefezellen**

**Heringssperma DNA-Lösung**

10 mg/ml DNA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**LiT**

100 mM Lithiumacetat

**LiT-PEG**

10 mM Tris pH 7,4  
50% (w/v) PEG4000 in LiT

**SORB**

100 mM Lithiumacetat  
10 mM Tris  
1 mM EDTA  
1M Sorbitol

#### 4.4.11 Lösungen zur Herstellung von modifiziertem Tabuchi-Medium (Verduyn et al., 1992)

##### Vitaminlösung

0,05 g Biotin (D-)  
1 g Calcium D(+) Panthotenat  
1 g Nicotinsäure  
25 g Myo-Inositol  
1 g Thiaminhydrochlorid  
1 g Pyridoxolhydrochlorid  
0,2 g para-Aminobenzoessäure

Das Biotin wird in 10 ml 0,1 M NaOH gelöst und anschließend mit 750 ml  $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$  gemischt. Der pH wird mit 1 M HCl auf 6,5 eingestellt. Während der pH beibehalten wurde, wurden alle Komponenten nacheinander gelöst (Biotin ist bei extremen pH-Werten instabil). Nachdem alle Komponenten gelöst wurden, wurde die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt und der pH auf 6,5 eingestellt. Die sterilfiltrierte Lösung konnte für maximal 3 Monate bei 4°C aufbewahrt werden.

##### Spurenelementlösung

15 g EDTA  
4,5 g Zinksulfat  
0,84 g Manganchlorid  
0,3 g Cobaltchlorid  
0,3 g Kupfersulfat  
0,4 g Di-Natriummolybdän  
4,5 g Calciumchlorid  
3 g Eisen(II)sulfat  
1 g Borsäure  
0,1 g Kaliumjodid

EDTA und Zinksulfat werden zunächst in 750 ml  $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$  gelöst und der pH mit NaOH auf 6,0 eingestellt. Während der pH mit NaOH ständig auf 6,0 gehalten wird, werden alle anderen Substanzen nach und nach gelöst. Wenn alle Komponenten gelöst sind, wird der pH auf mit 1 M HCl auf 4,0 eingestellt und die Lösung auf 1 L aufgefüllt. Die Sterilisierung erfolgt für 20 min bei 120°C. Bemerkung: Die sterile Lösung ist grün, oxidiert aber nach einiger Zeit zu braun. Dies beeinflusst die Lösung aber nicht. Die sterile Lösung kann bei RT für etwa 6 Monate aufbewahrt werden.

## 4.5 Mikrobiologische Nährmedien

### 4.5.1 Nährmedien für die Kultivierung von *U. maydis*

#### PD-Agar

24 g Potato Dextrose Broth  
15 g Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C. für 20 min autoklavieren.

#### PD-Charcoal-Agar

24 g Potato Dextrose Broth  
10 g Charcoal  
15 g Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

#### Regenerations-Agar

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
2,0 % (w/v) Saccharose  
182,2 g Sorbitol  
15 g Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

#### YEP-Agar

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose  
2,0 % (w/v) Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

#### YEPS<sub>light</sub>-Flüssigmedium

5 g Hefeextrakt  
10 g Pepton  
2,0 % (w/v) Saccharose  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

#### YNB-Flüssigmedium

1,7 g Yeast Nitrogen Base  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.  
Je nach Bedarf wurde nach dem Autoklavieren zugesetzt:



- 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat (sterilfiltriert)
- 2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose (sterilfiltriert)

### **YNB-Agar**

- 1,7 g Yeast Nitrogen Base
- 15 g Bacto-Agar

in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen, pH auf 5,6 einstellen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

Je nach Bedarf wurde nach dem Autoklavieren zugesetzt:

- 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat (sterilfiltriert)
- 2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose (sterilfiltriert)

### **YNB-Agarose für Tropftests**

- 1,7 g Yeast Nitrogen Base
- 15 g LE-Agarose

in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen, pH auf 5,6 einstellen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

Je nach Bedarf wurde nach dem Autoklavieren zugesetzt:

- 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat (sterilfiltriert)
- 2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose (sterilfiltriert)

### **NSY-Glycerin-Medium**

- 0,8 % (w/v) Nutrient Broth
- 0,1 % (w/v) Hefeextrakt
- 0,5 % (w/v) Saccharose
- 80 % (w/v) Glycerin

in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **modifiziertes Tabuchi-Medium (Verduyn et al., 1992)**

- 0,8 g Ammoniumchlorid
- 1 ml Spurenelementlösung
- 0,2 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat
- 0,5 g Kaliumdihydrogenphosphat

in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

Anschließend 100 ml 1 M MES-Pufferan (f.c. = 100 mM), 5 % (w/v) Glukose (sterilfiltriert), 140 mg Eisensulfat (gelöst in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) und 1 ml Vitaminlösung zusetzen.

**NSY-Glycerin-Medium(Einfriermedium für *U. maydis* und *S. cerevisiae*)**

8 g Nutrient Broth

5 g Saccharose

1 g Hefe-Extrakt

69,6 % (v/v) Glycerin

Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

**4.5.2 Nährmedien für die Kultivierung von *S. cerevisiae***

**Synthetic-Complete-Medium**

**Dropout-Mix -His -Leu -Trp -Ura**

0.5 g Adenin

2.0 g Alanin

2.0 g Arginin

2.0 g Asparagin-Säure

2.0 g Asparagin

2.0 g Cystein

2.0 g Glutaminsäure

2.0 g Glutamin

2.0 g Glycin

2.0 g Inositol

2.0 g Isoleucin

2.0 g Lysin

2.0 g Methionin

0.2 g para-Aminobenzoesäure

2.0 g Phenylalanin

2.0 g Prolin

2.0 g Serin

2.0 g Threonin

2.0 g Tyrosin

2.0 g Valin

**Für 1 Liter Medium (2x):**

3,6 g Yeast Nitrogen Base

3,4 g Dropout-Mix

10 g Ammoniumsulfat

40 g Glukose oder Galaktose

Der pH wurde mit NaOH auf 5,6 eingestellt.

Anschließend wurde das Medium für 20 min bei 121°C autoklaviert.

Je nach Selektionsmarker wurde zusätzlich nach dem Autoklavieren zugegeben:

0,3 mM Histidin

0,4 mM Tryptophan

0,2 mM Uracil

1,6 mM Leucin

Zur Kultivierung wurde das Medium im Verhältnis 1:1 mit Aqua<sub>[dest.]</sub> gemischt.

### Synthetic-Complete-Festmedium

500 ml Synthetic-Complete-Medium (2x)

500 ml H<sub>2</sub>O-Agar (4% w/v)

Flüssigmedium (mit entsprechenden Selektionsmarkern) und Agar wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und in sterile Petrischalen gegossen.

### 4.5.3 Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*

#### dYT-Flüssigmedium

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

in 1 l H<sub>2</sub>O lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

#### dYT-Festmedium

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar

in 1 l H<sub>2</sub>O lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren. Anschließend in sterile Petrischalen gießen.

#### dYT-Flüssigmedium mit Glycerin (Einfriermedium)

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Mit 69,6 % (v/v) Glycerin versetzen, auf 1 l H<sub>2</sub>O auffüllen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

## 4.6 Kultivierung von Mikroorganismen

### 4.6.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

#### Kultivierung von *E.coli* in Flüssigmedium

Flüssigkulturen von *E.coli* wurden, soweit nicht anders erwähnt, unter aeroben Bedingungen in autoklaviertem dYT-Medium bei 37°C angezogen. Das Medium wurde je nach Bedarf mit 100µg/ml Ampicillin, 20 µ/ml Gentamycin und/oder 25 µ/ml Chloramphenicol versetzt. Die Kultivierung von *E. coli* für die Überexpression rekombinanter Proteine im Stamm Rosetta (DE3) erfolgte bei 22°C über Nacht.

#### Kultivierung von *E.coli* auf Festmedium

Für die Anzucht von *E. coli* auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, dem je nach Bedarf 100µg/ml Ampicillin und/oder 25 µ/ml Chloramphenicol zugesetzt wurde.

#### Langzeitlagerung von *E. coli*

Für die Langzeitlagerung von *E. coli* wurden dicht gewachsene Übernachtskulturen im Verhältnis 1:1 mit dYT-Flüssigmedium mit Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

### 4.6.2 Kultivierung von *U. maydis*

#### Kultivierung von *U. maydis* in Flüssigmedium

Flüssigkulturen von *Ustilago maydis* wurden in der Regel in YEPS<sub>light</sub> Medium angezogen. In den Fällen, in denen die Anwesenheit bzw. die Abwesenheit einer Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle im Medium erforderlich war, wurde YNB-Medium verwendet, dem der entsprechende Stoff zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen bei 30°C inkubiert.

#### Kultivierung von *U. maydis* auf Festmedium

Für die Anzucht auf Festmedium wurde meist PD-Agar verwendet, dem bei Bedarf Fungizide, wie z.B. Carboxin, zugesetzt wurden. In besonderen Fällen wurde, aus oben beschriebenen Gründen, YNB-Agar verwendet.

#### Langzeitlagerung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis* Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen im Verhältnis 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C eingefroren.

#### Kultivierung von *U. maydis* zur quantitativen Analyse der Itaconsäure-Produktion

Die Anzucht von *U. maydis*-Stämmen zur Analyse der Itaconsäure-Produktion erfolgte in modifiziertem Tabuchi-Medium (MTM). Dazu wurden die entsprechenden Stämme in 10 ml MTM

in 100 ml Schikanekolben unter aeroben Bedingungen üN bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag auf eine finale OD<sub>600</sub> von 0,5 in 50 ml MTM verdünnt und für 48 h bei 30°C in 500 ml Schikanekolben unter aeroben Bedingungen weiter schüttelnd inkubiert.

### 4.6.3 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

#### Kultivierung von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium

Zur Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigkulturen wurde Synthetic-Complete-Medium (SC) verwendet, wobei auf gute Durchlüftung des Mediums geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd bei 30°C. Stämme, die ein Plasmid mit Auxotrophiemarker trugen, wurden in SC-Medium angezogen, das die Aminosäuren, auf deren Produktion entsprechend dem Marker selektioniert wurde, nicht enthielt.

#### Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium wurde 2-fach konzentriertes Synthetic-Complete-Medium (SC) mit Glukose genutzt, welches im Verhältnis 1:1 mit 2-fach konzentriertem Wasser-Agar gemischt wurde. Dabei wurden je nach Bedarf die entsprechenden Selektionsmarker zugesetzt.

#### Langzeitlagerung von *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von *S. cerevisiae* Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen im Verhältnis 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C eingefroren.

## 4.7 Molekularbiologische Techniken

### 4.7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* im analytischen Maßstab

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde eine Variante der "kochenden Lyse" verwendet. Hierbei wurden zunächst 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 50 µl Destroyer-Lysis-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für etwa 1 min bei 99°C inkubiert und anschließend direkt für 5 min auf Eis gestellt. Nach 10 minütiger Zentrifugation (13.000 rpm) wurden 5 µl des Überstandes in eine Testrestriktion eingesetzt.

Wenn besonders reine Plasmid-DNA z.B. für Sequenzierungen oder Transformationen benötigt wurde, erfolgte die Isolation mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep-Classik Kits nach Herstellerangaben.

### Präparation von chromosomaler DNA aus *Ustilago maydis*

Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus *U. maydis* wurden 2 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur abgenommen und in einem entsprechenden Reaktionsgefäß zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Sediment wurde in 500  $\mu$ l Lysis-Puffer resuspendiert und mit 0,3 g Glasperlen und 500  $\mu$ l Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde nach 10 minütigem Schütteln auf dem Vibrax zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Die obere, klare Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 96 %igem Ethanol gemischt und zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Der Niederschlag wurde mit 500  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet für 15 min bei 65°C getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 50  $\mu$ l TE mit RNaseA aufgenommen. Die Langzeitlagerung der präparierten DNA erfolgte bei -20°C.

### 4.7.2 Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren

#### Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Zur restriktionsenzymatischen Spaltung von DNA wurden Enzyme und korrespondierende Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Thermo-Scientific verwendet. Die jeweiligen Pufferbedingungen wurden nach den Herstellerangaben gewählt. Bei Doppelverdauen wurde auf die Puffer-Kompatibilitätstabellen der jeweiligen Hersteller zurückgegriffen.

#### Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA

Um die Selbstligation von Vektoren zu minimieren, wurden geschnittene Vektoren vor der Ligation mit Hilfe der Calf-Intestinal-Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Hierzu wurde nach Ende der restriktionsenzymatischen Spaltung 1  $\mu$ l SAP zum Restriktionsansatz gegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Sharp et al., 1973) ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde eine Suspension von 0,8 - 2 % Agarose in Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA (TAE)) bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und anschließend bis auf  $\approx$  60°C abgekühlt. Diese Lösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 1-5  $\mu$ g/ml mit Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten mit einem eingesteckten Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Die DNA wurde mit Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Als Größenstandard diente der kommerziell erhältliche Größenstandard Generuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix (Thermo-Scientific).

Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V. Nach erfolgter Auftrennung wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

### Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren, wurde diese zunächst mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda=360$  nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel/PCR DNA Fragments Extraktion Kit der Firma AidGene nach Herstellerangaben eluiert.

### Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels des Enzyms T4-DNA-Ligase ligiert. Ligationen erfolgten in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l. Der Vektor und das zu ligierende Fragment wurden im Verhältnis 1:10 eingesetzt. Es wurden zusätzlich 2  $\mu$ l Ligationspuffer und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase sowie steriles Wasser bis zu einem Endvolumen von 20  $\mu$ l eingesetzt. Die Ligation erfolgte für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 16°C. Anschließend erfolgte eine Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes.

### DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) bei der Firma eurofins MWG Operon, Ebersberg. Die Reaktionszusammensetzungen wurden den Herstellerangaben folgend gewählt: etwa 1  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden mit jeweils 20 Primer in einem gesamt-Ansatz von 15  $\mu$ l gemischt.

### Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten definierter Größe und Sequenz wurde die Southern Blotting Methode (Southern, 1992) durchgeführt. Dabei wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Das Gel wurde erst für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und danach für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Zur Übertragung der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Roth) wurde eine Glasplatte über ein Bassin mit 0,4 M NaOH gelegt. Quer über die Glasplatte wurde ein Streifen in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier so aufgelegt, dass beide Enden ins Vorratsbassin eintauchten. Dann wurde das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten aufgelegt, gefolgt von der, mit Transferpuffer benetzten, Nylonmembran und drei Schichten in Puffer getränktem Blotting-Papiers. Um die aufwärtsgerichteten Kapillarkräfte zu unterstützen, wurde eine dicke Schicht saugfähiges Papier aufgelegt und die Konstruktion mit einem Gewicht beschwert. Das Gel wurde für mindestens zwei Stunden oder über Nacht geblotet. Die Membran wurde nach dem Blotten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm<sup>2</sup>) im Stratalinker 2400 (Stratagene) fixiert. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Gilbert and Church, 1984). Dazu wurde die Membran 20 min bei 65°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und hinzugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Es

wurde über Nacht bei 65°C inkubiert und die Membran anschließend in 2x 15 ml Southern-Waschpuffer 20 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und für mindestens zwei Stunden in einer Phosphoimager Kassette (Amersham) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, Amersham).

### Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Zur Herstellung der radioaktiven Sonden wurde das Megaprime Labeling System Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet. Dabei wurden 25 ng DNA mit einer Länge von etwa 1000 bp mit 5 µl der Primer-Lösung (Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz) und destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 33 µl aufgefüllt und im Heizblock bei 95°C 5 min denaturiert. Danach wurde der Ansatz kurz anzentrifugiert und 10 µl Reaktionspuffer (Puffersubstanzen und alle dNTPs außer dCTP), 1,8 µl Klenow Polymerase und 5 µl  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zugegeben. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 3 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die Sonde wurde dann mit Hilfe einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation von überschüssigem radioaktivem Material gereinigt. In einem letzten Schritt wurde die Sonde noch einmal für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend zur Nylonmembran in den Hybridisierungspuffer gegeben.

### 4.7.3 PCR-Techniken

#### Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Die PCR-Reaktion (Bell, 1989; Mullis et al., 1986; White et al., 1989) dient der Amplifikation von spezifischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Durch eine thermostabile Polymerase werden mit Hilfe von Primern und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert.

Die PCR-Reaktion läuft in 4 charakteristischen Schritten ab. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94°C denaturiert und so in einzelsträngige DNA überführt. Bei einer Temperatur zwischen 50-72°C binden die PCR-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Die thermostabile Polymerase synthetisiert anschließend ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang, hierbei wird die Temperatur dem Optimum der jeweiligen Polymerase angepasst. Durch eine erneute Denaturierung bei 94°C beginnt der Zyklus erneut.

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 50 µl wie folgt durchgeführt:



10  $\mu$ l 5x GC-Puffer  
 1,5  $\mu$ l DMSO  
 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM)  
 1  $\mu$ l 5'Primer (10 mM)  
 1  $\mu$ l 3'Primer (10 mM)  
 1  $\mu$ l Matrizen-DNA ( $\approx$  100ng)  
 0,5  $\mu$ l Phusion DNA-Polymerase (=2,5 U)  
 H<sub>2</sub>O ad 50  $\mu$ l

### Standardprotokoll

95°C 5 min  
 95°C 1 min  
 50-72°C 30 s  
 72°C 1 min  
 72°C 10 min  
 14°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35x wiederholt.

### quantitative RealTime PCR (qPCR)

Zur quantitativen Bestimmung von mRNA-Leveln wurde die quantitative RealTime PCR durchgeführt (Wang et al., 1989; Higuchi et al., 1993). Dazu wurden etwa 1  $\mu$ g Gesamt-RNA aus *U. maydis* mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. 1  $\mu$ l einer 1:10 verdünnten cDNA Lösung wurden anschließend unter Verwendung des Maxima SYBR-Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) auf die relative Transkriptmenge analysiert. Die Analyse erfolgte in einem BioRad-iCycler (BioRad, München) mit dem folgenden Programm:

### Standardprotokoll

95°C 1 min 30 s  
 95°C 15 s  
 60°C 30 s  
 72°C 30 s

Die Schritte 2 bis 4 wurden 44x wiederholt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der BioRad-Software (Version 3.0a), sowie des BioRad Gene Expression Makros. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch eine Analyse der Schmelzkurven überprüft. Als Referenz bzw. als sogenanntes *housekeeping gene* diente dabei die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (*ppi*; um03726.2). Die Effizienz der verwendeten Oligonukleotide wurde mit einer Eichkurve bestimmt, die durch die serielle Verdünnung einer cDNA-Probe generiert wurde. Die Bestimmung der Signifikanz der erhaltenen Werte erfolgte durch einen einseitigen Students-T-Test.

## Verwendete RealTime-PCR-Primer

Name	Sequenz	Länge (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Produkt (bp)
19 RT 05074 fwd	gatttgctaacttggcgctc	20	59,988	111
20 RT 05074 rev	ccttgctctttgcattagcc	20	59,982	
21 RT 12299 fwd	tgtttgctgcttggtctcg	20	60,025	282
22 RT 12299 rev	tcttgacagtggttctgctg	20	60,025	
23 RT 05076 fwd	caatgcaacacaacctggac	20	60,008	212
24 RT 05076 rev	gagtttttcaagctcggtgc	20	60	
25 RT 11777 fwd	tgaaacgcttcgagtcattg	20	59,988	267
26 RT 11777 rev	tgcttgaacagatacggcag	20	60,011	
27 RT 11778 fwd	attcgttgacctccaaggtg	20	59,966	168
28 RT 11778 rev	gacctcgttcaatggcaaatt	20	59,939	
29 RT 05079 fwd	tatctccgatcgaggtggtc	20	60,034	150
30 RT 05079 rev	tggtcttgagcatactgcgg	20	60,011	
31 RT 05080 fwd	gcgttacagaccgaaaccat	20	60	242
32 RT 05080 rev	atcggtgacgtttcttggac	20	59,973	

## 4.7.4 Transformation von Mikroorganismen

Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Um chemisch kompetente *E.coli*-Zellen des Strammes Top10 herzustellen, wurde die Calcium-Mangan-Methode nach (Hanahan et al., 1991) verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in SOB-Medium ohne Magnesium bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 angezogen. Wenn die Kultur diese Zelldichte erreicht hatte, wurden die Zellen für 10 min in Eiswasser gekühlt und durch Zentrifugation (15 min, 3200rpm) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/3 Volumen eiskalten CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationschritt (15 min, 3200rpm) wurden die sedimentierten Zellen in 1/12 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert, in jeweils 70 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Transformation von chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA wurde 1 µl der Plasmid-DNA (bei Ligationen 5-10 µl) mit 70 µl chemisch kompetenter Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der gesamte Ansatz für 90 sec auf 42°C erhitzt und anschließend auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Die Transformation der Hefe *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer Variante der Lithiumacetat-PEG-Transformation (H. Ulrich, pers. Mitteilung). Der zu transformierende Hefestamm wurde in 50 ml YPD oder Selektionsmedium über Nacht bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub>

von 0.5 bis 1.5 angezogen. Die Kultur wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in einem angepassten Volumen LiT aufgenommen ( $1300\ \mu\text{l} \approx 12$  Transformationen).  $100\ \mu\text{l}$  dieses Ansatzes wurden in ein  $1,5\ \text{ml}$  Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden  $5\ \mu\text{l}$  ( $10\text{mg/ml}$ ) denaturierte (für 5 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und dann auf Eis abgekühlt) Heringssperma-DNA und  $1\ \mu\text{g}$  Plasmid-DNA ( $1\ \mu\text{l}$  Midipräp oder  $4\ \mu\text{l}$  Minipräp) hinzugefügt. Zu diesem Ansatz wurden  $500\ \mu\text{l}$  LiT-PEG zugeben und gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bis 1h bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden  $50\ \mu\text{l}$  DMSO zugegeben. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 15 min bei  $42^\circ\text{C}$ . Nach Ende des Hitzeschocks wurde der Ansatz für 30 s bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in  $100\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

### Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis*-Protoplasten wurden 50 ml YEPS-Flüssigkulturen der jeweiligen Stämme bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,8 - 1,0 angezogen und anschließend zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT). Das Zellsediment wurde in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT). Dann wurde das Sediment in 2 ml SCS-Lysing-Enzyme-Lösung aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Bei einer Verkuglung der Zellen von ca. 70% wurde die Reaktion durch Zugabe von 10ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelettiert (2300 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Sediment wurde noch zweimal mit 10 ml SCS-Lösung gewaschen und in  $500\ \mu\text{l}$  STC-Lösung aufgenommen. Die Protoplasten wurden in Volumina von  $50\ \mu\text{l}$  aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

Transformation von *U. maydis*-Protoplasten Zur Transformation wurden  $50\ \mu\text{l}$  *U. maydis*-Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit  $10\ \mu\text{l}$  (ca. 500 ng) der zu transformierenden DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden  $500\ \mu\text{l}$  STC/PEG zugegeben und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar gegeben und vorsichtig verteilt. Der Regenerationsagar wurde kurz vor der Transformation in zwei Schichten gegossen, von denen die untere das zur Selektion benötigte Antibiotikum in zweifacher Konzentration enthielt (Hygromycin:  $400\ \mu\text{g/ml}$ , Carboxin  $4\ \mu\text{g/ml}$ , Nourseothricin:  $300\ \mu\text{g/ml}$ ). Die obere Schicht war frei von Antibiotika. Durch das Konzentrationsgefälle wurde gewährleistet, dass sich erst nach und nach die zur Selektion benötigte Antibiotikakonzentration durch Diffusion einstellte. Die Platten wurden bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert.

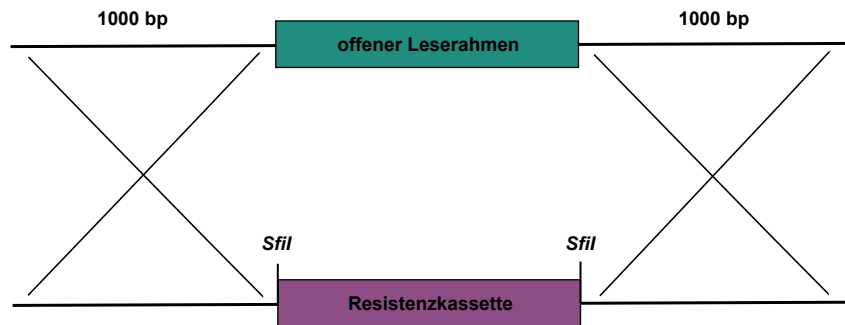
### 4.7.5 Genetische Modifikation von *U. maydis*

*U. maydis* besitzt ein hoch effizientes Rekombinationssystem. Dieses kann man nutzen, um mittels homologer Rekombination das Genom von *U. maydis* zu modifizieren.

#### Herstellung von Deletionsmutanten in *U. maydis*

Zur Deletion von Genen wurde der offene Leserahmen des jeweiligen Gens durch eine Antibiotika-Resistenzkassette ersetzt. Hierzu wurden homologe Bereiche von etwa 1000 bp, die die aus-

zutauschende Region links und rechts flankieren, mittels PCR amplifiziert. Durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* wurden diese Flanken mit einem geeigneten Vektor und einer Antibiotika-Resistenzkassette verknüpft. Die Resistenzkassette liegt hierbei zwischen den beiden flankierenden Bereichen. Nach Vermehrung in *E. coli* wurde das Konstrukt mit den beiden flankierenden Regionen und der Resistenzkassette mit *SspI* aus dem Vektor herausgeschnitten und *U. maydis* mit diesem DNA-Fragment transformiert. Durch homologe Rekombination wird die Resistenzkassette an Stelle des jeweiligen Gens eingebaut (vergleiche Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1: Genetische Modifikationen von *U. maydis***

Schematische Darstellung der Herstellung von Deletions-Mutanten in *U. maydis*. Durch homologe Rekombination wird das entsprechende Gen durch eine Antibiotika-Resistenzkassette ersetzt.

### Herstellung von Deletionskonstrukten für *U. maydis* mittels *in vivo*-Rekombination in *S. cerevisiae* ("Drag and Drop")

Die Herstellung von Konstrukten für die Transformation von *Ustilago maydis* erfordert mehrere Schritte, die oftmals mit einem größeren Zeit- und Arbeitsaufwand einhergehen. Aus diesem Grund wurde eine Ein-Schritt-Methode zur Herstellung dieser Konstrukte genutzt (Jansen et al., 2005). Diese Methode macht sich die Eigenschaften der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu nutze, homologe Rekombination mit sehr kurzen Homologie-Regionen (es reichen 29 bp) hoch effizient durchzuführen. Diese wurde genutzt, um Konstrukte für die genetische Manipulation von *U. maydis* durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* herzustellen. Die folgenden Schritte beschreiben die Erstellung eines Konstruktes für die Deletion von Genen in *Ustilago maydis*. Konstrukte für andere Manipulationen des Genoms wie z.B. das Erstellen von GFP-Fusionen können über entsprechende Anpassung der flankierenden Bereiche und Kassetten durchgeführt werden. Zunächst wurden 1000 bp lange Bereiche oberhalb (linke Flanke) und unterhalb (rechte Flanke) des zu deletierenden Gens durch PCR amplifiziert. Diese Flanken waren so konstruiert, dass sie eine 29 bp lange Homologieregion sowohl zum Hefevektor pRS426 (2 $\mu$ -Shuttleplasmid, Ura3-Auxotrophiemarker) als auch zur Resistenzkassette besaßen. Für die Herstellung der Konstrukte wurde ein Resistenzkassettensystems benutzt, das speziell für den Gebrauch in *U. maydis* konzipiert ist (Brachmann et al., 2004). Die Resistenzkassetten dieses Systems werden von *SfiI*-Schnittstellen flankiert. Der rückwärtsgerichtete Primer der linken Flanke und der vorwärtsgerichtete Primer der rechten Flanke des zu deletierenden Gens, sind mit Homologieregionen zu der Resistenzkassette versehen, beginnend mit den entsprechenden

*Sfi*I-Schnittstellen. In den vorwärtsgerichteten Primer der linken Flanke und den rückwärtsgerichteten Primer der rechten Flanke wurden dagegen die passende Homologieregion zum Hefvektor und *Ssp*I-Schnittstellen eingefügt. Die *Ssp*I-Schnittstellen dienten zum Herausschneiden des Konstruktes aus dem fertigen Vektor. Zur Vorbereitung wurde der Hefvektor pRS426 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RII geöffnet und die Resistenzkassette aus dem entsprechenden Vektor mit *Sfi*I ausgeschnitten. Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden schließlich 200 ng des verdauten Hefvektors mit jeweils 500 ng DNA der beiden Flanken und 500 ng DNA der eluierten Resistenzkassette gemischt. Die anschließende Regeneration und Selektion der Transformanten erfolgte auf SC-Festmedium ohne Uracil für 2 Tage bei 30°C.

### ""Plasmid-rescue"" aus *S. cerevisiae*

Befanden sich entsprechend viele Transformanten auf dem Selektions-Festmedium, wurden die Kolonien mit 1 ml H<sub>2</sub>O von der Platte gespült und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden geerntet (1 min, 13.000 rpm) und das Pellet in 200 µl der Lösung I des ZR Plasmid Mini Kits (Zymo) resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl Glasperlen hinzugegeben und die Mischung für 15 Minuten auf dem Vibrax auf maximaler Stufe geschüttelt. Die Zellsuspension wurde von den Glasperlen getrennt und in ein neues Reagiergefäß überführt. Nach Zugabe von Puffer 2 wurde die Suspension für 5 min bei RT inkubiert (Lyse). Anschließend wurde die Plasmidisolation gemäß Herstellerprotokoll weiter durchgeführt. 5 µl des Eluats wurden für eine Transformation von *E. coli* zur Vermehrung der erhaltenen Plasmide benutzt. Die Plasmide wurden anschließend wieder isoliert und mit Hilfe von Restriktionsverdauen analysiert.

### 4.7.6 Integration von Vektoren in den genomischen *ip*-Locus

Der *cbx*- bzw. *ip*-Locus von *U. maydis* kodiert für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase (Sdh1). Ein Aminosäureaustausch an Position 257 von Histidin nach Leucin führt dazu, dass der Organismus eine Resistenz gegen das Fungizid Carboxin entwickelt. Spezielle Vektoren tragen dieses Carboxinresistenz-vermittelnde Allel des *ip*-Gens. Der entsprechende Vektor kann durch eine *Ssp*I Schnittstelle in dem *ip*-Allel linearisiert werden und nach Transformation in *U. maydis* durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen *ip*-Locus integrieren. Durch die Integration des Vektors wird der *ip*-Locus verdoppelt.

## 4.8 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

### 4.8.1 Produktion von rekombinanten Proteinen

Rekombinante Proteine wurden als N-terminale GST-Fusionsprotein in *Escherichia coli* produziert (Self and Hall, 1995). Zur Expression dieser Konstrukte wurden die entsprechenden codierenden Bereiche in den GST-Expressionsvektor pGEX4T-1 kloniert. Nach klonaler Vermehrung in *E. coli* und Verifikation der resultierenden Expressionsvektoren durch Sequenzierung wurden

die entsprechenden *E. coli*-Stämme mit den Vektoren transformiert. Die idealen Bedingungen für die Proteinproduktion wurden zunächst anhand einer Induktion im kleinen Maßstab bestimmt und dann eine Großkultur unter den entsprechenden Bedingungen induziert. Es wurde zunächst eine Vorkultur angezogen, aus der dann eine Großkultur im Verhältnis 1:100 inokuliert wurde. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,6 wurde die Temperatur für Rosetta (DE3)-Stämme auf 22°C gesenkt und die Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert. Die Induktion erfolgte über Nacht. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

### 4.8.2 Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli*

Alle Reinigungsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C). Die sedimentierten Zellen wurden in Lysepuffer, der mit Protease-Inhibitoren (Complete<sup>tm</sup> ohne EDTA (Roche)) versetzt war, resuspendiert und mittels 3 Passagen durch eine "French-Press"-Zelle lysiert. Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt (23.000 rpm, 1h) sedimentiert. Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe von Glutathion Sepharose Beads (Macherey und Nagel). Der Überstand wurde auf 300µl Beads aufgetragen und für 1 Stunde rollend inkubiert, dreimal mit Lysepuffer gewaschen (700 x g, 2 min) und anschließend mit Elutionspuffer (30 min, 4°C) eluiert. Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels überprüft.

## 4.9 Analyse von Proteinen

### 4.9.1 Proteinextraktion aus *U. maydis*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *U. maydis* wurden 200 ml einer Flüssigkultur OD<sub>600</sub>=0,8 zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT) und das Sediment in 10 ml TBS-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3500 rpm, 5 min, RT) wurde das Sediment erneut in 10 ml TBS aufgenommen. Der Zellsuspension wurden 100 µl 10 % Triton X-100 und 100 µl Protease Inhibitor Cocktail für Pilze (Sigma) zugesetzt und der Ansatz in Mühlbechern in flüssigen Stickstoff eingefroren. In die Mühlbecher wurden dann zwei Metallkugeln gegeben und die Becher fest verschraubt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte 10 min bei 30 mips. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und bei RT inkubiert bis die Suspension wieder aufgetaut war. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Langzeitlagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

### 4.9.2 Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976), allerdings in einer modifizierten Form mit Biorad-Reagenz (Biorad). 1 µl Proteinlösung wurde mit 1 ml der um den Faktor 1:5 verdünnten Biorad-Lösung gemischt. Der Nachweis erfolgte sofort im Photometer

bei einer Wellenlänge von 595nm. Zur Standardisierung wurden BSA-Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen eingesetzt.

#### 4.9.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteinextrakte wurden SDS-haltige Polyacrylamidgele genutzt.

Komponente	%	1 M Tris pH8,8	1 M Tris pH6,8	SDS	Aa/Bis 30:0,8	H <sub>2</sub> O	APS	TEMED
Trenngel	10	2250 $\mu$ l	-	75 $\mu$ l	2000 $\mu$ l	1600 $\mu$ l	100 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Sammelgel	-	-	375 $\mu$ l	30 $\mu$ l	500 $\mu$ l	2050 $\mu$ l	50 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l

Für die Proteingele wurden Mini-Protean 2 Apparaturen (Biorad) verwendet. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, auf ihre Dichtheit überprüft. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels, wurde der Alkohol vollständig abgenommen, das Sammelgel eingegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels, wurde der Kamm entfernt, die Taschen sorgfältig gespült und das Gel in die vertikale Laufkammer eingesetzt. Die äußere und die innere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden in TBS auf eine Konzentration von 2  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt und je 10  $\mu$ l dieser Proteinlösung mit 3  $\mu$ l 5x Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden 5 min zur Denaturierung aufgekocht, kurz auf Eis heruntergekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Als Größenstandard wurde der Marker "Page Ruler Prestained Protein Ladder" der Firma Thermo Scientific verwendet.

#### 4.9.4 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Roth) wurde ein "Wet Blot" durchgeführt. Der Blot wurde auf die Anodenplatte der Blotapparatur aufgeschichtet. Ein in Transferpuffer getränktes Schwämmchen wurden mit zwei Lagen getränktes Blotting-Papier überschichtet. Darauf wurde die, durch Benetzen mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte, PVDF-Membran gelegt. Das Trenngel wurde auf die Membran aufgelegt und mit zwei Lagen in Transferpuffer getränkter Blotting-Papiere und einem weiteren Schwämmchen überschichtet. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und das Gel eine Stunde gekühlt bei 100 V oder über Nacht bei 30V geblottet.

Die Membran wurde in TBST<sub>0,1</sub>-Milch 20 min unter Rotation abgesättigt und in einen Plastikbeutel eingeschweißt. In diesen wurden 10 ml einer 1:500 Verdünnung des primären Antikörpers (GFP mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, Santa Cruz Biotechnology) in TBST<sub>0,1</sub>-Milch eingefüllt. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Dann

wurde die Membran 2x 10 min in 10 ml TBST<sub>0,1</sub> gewaschen und anschließend mit einer 1:1000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (donkey anti-mouse IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology) in TBST<sub>0,1</sub>-Milch eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz wurde die Membran 2x 10 min in 10 ml TBST<sub>0,1</sub> gewaschen, abgetropft und in eine nach drei Seiten hin offene Plastikhülle gelegt. 0,5 ml der Detektionslösung 1 wurden mit 0,5 ml der Detektionslösung 2 (Amersham) gemischt und auf die Membran aufgetropft. Überschüssige Lösung wurde zu den Seiten hin aus der Plastikhülle gestrichen. Die Membran wurde in ihrer Hülle in eine Röntgenkassette eingelegt, ein Film aufgelegt und der Blot für 15 min in der geschlossenen Kassette exponiert. Dann wurde der Film entwickelt.

Die Membran wurde 1 min in einer Schale Ponceau-S-Lösung (Sigma) gebadet und dann so lange in Wasser entfärbt, bis die Gesamtheit der Proteinbanden auf ihr deutlich sichtbar waren.

### 4.9.5 Gesamtproteinnachweis durch Anfärben des SDS-Geles

Die Gesamtheit der Proteinbanden wurde durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-blue sichtbar gemacht. Das Gel wurde in die Färbelösung eingelegt und kurz aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurde das Gel so lange in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Das angefärbte Gel wurde fotografiert.

### 4.9.6 Analyse der enzymatischen Aktivität von Proteinen

Die enzymatische Aktivität der in der Itaconsäure-Biosynthese involvierten Enzyme wurde mit Hilfe eines simplen Assays bestimmt. Dazu wurden 10 µg der jeweiligen aufgereinigten Enzyme mit Assaypuffer, welcher 5 mM des zu testenden Substrates enthielt, in einem Volumen von 100 µl gemischt. Als Reagiergefäß diente dazu eine 96-Well Mikrotiterplatte (Greiner). Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC auf ihre enzymatische Reaktion hin analysiert.

## 4.10 Zellbiologische Untersuchung von *U. maydis*

### 4.10.1 Infektion von *Zea mays*

Zur Überprüfung der Pathogenität von *U. maydis* wurden sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte *Early Golden Bantam* infiziert. Dazu wurden die entsprechenden Stämme mit H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Anschließend wurden 500 µl der Zellsuspension mit Hilfe von Spritzen ungefähr 1 cm über der Erde in den Stengel der Maispflanze injiziert, so dass möglichst das dritte Keimblatt der Pflanze infiziert werden konnte. Die Pflanzen wurden bei 28°C am Tag und 20°C in der Nacht für 10-13 Tage in einem geschlossenen Gewächshaus inkubiert bevor die Symptome ausgewertet wurden. Die Beleuchtungsstärke betrug zwischen 28.000 und 90.000 Lux, abhängig von der zusätzlichen Sonneneinstrahlung. Die Auswertung erfolgte nach modifizierten Kriterien nach (Kämper et al., 2006). Alle Experimente wurden in mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt. Ein Experiment entspricht dabei etwa 40 Pflanzen pro zu testendem



Stamm. Die mittleren Symptome aus den drei Replikaten wurden prozentual zur Gesamtzahl der Pflanzen dargestellt.

#### 4.10.2 Test auf filamentöses Wachstum auf PD-Aktivkohle-Medium

Auf Aktivkohle-haltigem Medium bildet Hyphen aus, die im Zellzyklus arretiert sind und die auf der schwarzen Oberfläche des Mediums sehr gut sichtbar sind (Day and Anagnostakis, 1973). Zur Untersuchung der Hyphenbildung wurden Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen und die kompatiblen Stämme 1:1 gemischt. 6 µl dieser Suspension wurde dann auf den Agar getropft. Alternativ wurden Kulturen des haploid pathogenen Stammes SG200 verwendet.

#### 4.10.3 Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen

Zur Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen kam ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 2 (Zeiss) zum Einsatz. Die Färbungen erfolgten mit den Fluoreszenzfarbstoffen, die in der folgenden Tabelle angegeben sind. Sie wurden (bis auf GFP, mKate, RFP) den Flüssigkulturen in der genannten Endkonzentration zugesetzt. Die Inkubationszeit mit dem Farbstoff reichte von 10 min (CMAC und Calcofluor), bis zu einer Stunde (FM4-64). Die zu untersuchenden Zellen wurden im Volumen von 1,5 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht bedeckten Objektträger aufgetropft. Anschließend wurde das Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente zur Fixierung der Zellen an ihrer Position um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der verschiedenen Farbstoffe wurden die zur Wellenlänge passenden Filter genutzt. Vergleichsfotos wurden im Differentialkontrast gemacht und mit einer Kamara der FA Hamamatsu (Typ Orca-ER) dokumentiert. Die Bilder wurden mit dem Programm Volocity (Improvision) und dem Programm ImageJ bearbeitet.

Name	Zellbestandteil	Excitation	Emission	Farbe
GFP	Fusionsproteine	475 nm	509 nm	grün
RFP	Fusionsproteine	584 nm	607 nm	rot
mKate	Fusionsproteine	588 nm	635 nm	rot
Calcofluor	Glucan	350 nm	461 nm	blau
MitoTracker Rhodamine B	Mitochondrien	590 nm	640 nm	rot
FM4-64	Endozytische Membranen	590 nm	640 nm	rot
CMAC	Vakuolen	350 nm	466 nm	blau

#### Kernfärbung

Für die Kernfärbung mittels DAPI wurden Zellen fixiert. Dazu wurde 1 ml Übernachtskultur bei 5000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und in 70% Ethanol in 1 x PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen und mit 2 µg/ml DAPI gemischt. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Filter betrachtet.

#### 4.10.4 Zellwandfärbung

Für die Färbung der Zellwand wurden 100  $\mu$ l Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur mit Calcofluor White (2  $\mu$ g/ml) gefärbt, auf einen Objektträger gegeben und mit dem DAPI-Filter betrachtet.

#### Endocytosefärbung

1 ml Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur wurden für fünf Minuten bei 4500 rpm abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und für fünf Minuten mit 16  $\mu$ M FM4-64 (Vida and Em, 1995) auf Eis gefärbt. Dann wurde das Volumen auf ein 1 ml aufgefüllt und die Zellen bei 30°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen, auf einen Objektträger gegeben und mit dem Rhodamin-Filter betrachtet.

#### Vakuolenfärbung

Vakuolen wurden mit CellTracker™blue (CMAC) gefärbt. Hierfür wurde eine bereits mit FM4-64 gefärbt Kultur nach Ablauf von 55 Minuten mit 100  $\mu$ M CMAC versehen und für weitere fünf Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit dem DAPI-Filter betrachtet.

#### Mitochondrienfärbung

Mitochondrien wurden mit MitoTracker Rhodamine B angefärbt. Dazu wurden die Zellen einer Kultur (1 ml; OD<sub>600</sub>=0,8) für 2 min bei 6500 rpm geerntet. Das Pellet wurde in 1 ml 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit 2% Glukose resuspendiert. Dazu wurden 100  $\mu$ l MitoTracker Rhodamine B (1gelöst in DMSO) gegeben und der Ansatz 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen noch dreimal in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) gewaschen. 10  $\mu$ l der Zelllösung wurden auf einen Objektträger gegeben und schließlich mit dem Rhodamin-Filter betrachtet.

### 4.11 Biochemische Methoden

#### 4.11.1 Analyse der Itaconsäure-Produktion durch *High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC)*

Die quantitative Bestimmung der Itaconsäure-Produktion durch *U. maydis* bzw. durch *S. cerevisiae*, wurde mit Hilfe eines HPLC-Chromatogramms durchgeführt. Die Kultivierungen und die quantitative Bestimmung der Itaconsäure-Produktion im Teil 2.1 wurden von Elena Geiser (AG Blank, RWTH Aachen) im Rahmen einer Kollaboration durchgeführt. Material und Methoden hierfür können in (Geiser, 2014) nachgelesen werden. Für die Analyse des Enzym-Aktivitäts-Assays wurden 100  $\mu$ l der Probe in einen Mikroeinsatz mit Polymerfuß überführt und für die HPLC-Analyse verwendet. 5  $\mu$ l der Probe wurden dann in das HPLC-System (1260 Infinity Series, Agilent Technologies) injiziert und analysiert.

Laufmittel: 2,5 mM Schwefelsäure

Säule: Rezex-ROA-Organic Acid H+ (8%), 7,6 mm x 250 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

Flussrate: 0,8 ml/min (ca. 65 bar)

Temperatur: ca. 40°C

Detektor: VWD 1260 (1260 Infinity Series, Agilent Technologies)

Wellenlänge: 210 nm

Datenanalyse: OpenLab CDS Version ChemStation

<b>Organische Säure</b>	<b>Retentionszeit</b>
-------------------------	-----------------------

Itaconsäure	11.3
<i>trans</i> -Aconitat	8.8, 5.8
<i>cis</i> -Aconitat	5.8, 8.8
Citrat	6.8, 5.0
Isocitrat	5.0, 6.9, 13.8

# Literaturverzeichnis

- Ambler, J. and Roberts, E. (1948) The effect of pH on the stability of cis-aconitic acid in dilute solution. *Journal of organic chemistry*, **13**, 399–402.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994) Identification of fuz7, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367–78.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965–76.
- Baup, S. (1837) Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. *Ann. Chim. Phys.*, **19**, 29–38.
- Bell, J. (1989) The polymerase chain reaction. *Immunol Today*, **10**, 351–355.
- Bentley, R. and Thiessen, C. P. (1955) Cis-aconitic Decarboxylase. *Science*, **122**, 330.
- Bentley, R. and Thiessen, C. P. (1957) Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*: I . tracer studies with C14-labeled Substrates. *The Journal of biological chemistry*, **226**, 673–678.
- Berg, R. and Hetzel, D. (1978) Preparation of citraconic anhydride.
- Bohman, V. R., Lesperance, A. L., Harding, G. D. and Grunes, D. L. (1969) Induction of Experimental Tetany in Cattle . *Journal of animal sciences*, **29**, 99–102.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P. and Keller, N. P. (2006) Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, **61**, 1636–45. ISSN 0950-382X.
- Bölker, M., Basse, C. W. and Schirawski, J. (2008) *Ustilago maydis* secondary metabolism-from genomics to biochemistry. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **45 Suppl 1**, S88–93. ISSN 1096-0937.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441–50. ISSN 0092-8674.
- Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A. M., Role, C., Beloeil, J. C. and Ducrocq, C. (1995) Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Journal of bacteriology*, **177**, 3573–8. ISSN 0021-9193.

- Boothroyd, B., Thorn, J. A. and Haskins., R. H. (1956) Biochemistry of the Ustilaginales: XII. Characterization of extracellular glycolipids produced by *Ustilago* sp. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34**, 10–14.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics : MGG*, **272**, 216–26. ISSN 1617-4615.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.
- Brakhage, A. (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews. Microbiology*, **11**, 21–32. ISSN 1740-1534.
- Brock, M., Fischer, R., Linder, D. and Buckel, W. (2000) Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Molecular microbiology*, **35**, 961–973.
- Budde, A. and Leong, S. (1989) Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia*, **108**, 125–133.
- Bureau, R. and Stout, R. (1965) Trans-Aconitic Acid in Range. *Science*, **150**, 766–767.
- Chiusoli, G. (1962) Process for preparing itaconic acid and 2,3-butandienoic acid.
- Day, P. and Anagnostakis, S. (1973) The Killer System in *Ustilago maydis*: Heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathology*, **63**, 1017–1018.
- DoE (1999) 10 CFR Part 490 Alternative Fuel Transportation Program; P-series Fuels. Technical report, Dept of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, 1999.
- Drew, S. W. and Wallis, D. A. (1983) *Secondary Metabolism and differentiation in fungi*. New York.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P. and Kahmann, R. (2006) A ferrooxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *The Plant cell*, **18**, 3332–45. ISSN 1040-4651.
- Fluharty, A. L. and O'Brien, J. S. (1969) A mannose- and erythritol-containing glycolipid from *Ustilago maydis*. *Biochemistry*, **8**, 2627–2632.
- Freitag, J., Ast, J., Linne, U., Stehlik, T., Martorana, D., Bölker, M. and Sandrock, B. (2014) Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Molecular microbiology*, **93**, 24–36. ISSN 1365-2958.
- Garvey, G. S., Rocco, C. J., Escalante-Semerena, J. C. and Rayment, I. (2007) The three-dimensional crystal structure of the PrpF protein of *Shewanella oneidensis* complexed with trans-aconitate: insights into its biological function. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **16**, 1274–84. ISSN 0961-8368.

- Geilen, F. M. A., Engendahl, B., Harwardt, A. and Marquardt, W. (2010) Selective and Flexible Transformation of Biomass-Derived Platform Chemicals by a Multifunctional Catalytic System. *Angewandte Chemie*, **122**, 5642–5646.
- Geiser, E. (2014) *Itaconic acid production by Ustilago maydis*. Dissertation, RWTH Aachen.
- Gilbert, G. M. and Church, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1991–1995.
- Gregor, P., Sawadogo, M. and Roeder, R. (1990) The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev*, **4**, 1730–1740.
- Grimek, T. L. and Escalante-Semerena, J. C. (2004) The acnD Genes of *Shewanella oneidensis* and *Vibrio cholerae* Encode a New Dehydratase Enzyme That Requires prpF Function In Vivo The acnD Genes of *Shewanella oneidensis* and *Vibrio cholerae* Encode a New Fe / S-Dependent 2-Methylcitrate Dehydratase Enzyme Th. *Journal of bacteriology*, **186**, 454–462.
- Guevarra, D. and Tabuchi, T. (1990a) Accumulation of Itaconic , 2-Hydroxyparaconic , Itatartaric , and Malic Acids by Strains of the Genus *Ustilago*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2353–2358.
- Guevarra, E. D. and Tabuchi, T. (1990b) Production of 2-Hydroxyparaconic and Itatartaric Acids by *Ustilago cynodontis* and Simple Recovery Process of the Acids. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2359–2365.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R. (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, **204**, 63–113.
- Haskins, R., Thorn, J. and Boothroyd, B. (1955) Biochemistry of the Ustilaginales: XI. Metabolic products of *Ustilago zeae* in submerged culture. *Can J Microbiol*, **1**, 749–756.
- Haskins, R.H., and Thorn, J. (1951) Biochemistry of the ustilaginales: VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. *Can J Bot*, **29**, 585–592.
- Hermann, B. and Patel, M. (2007) Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: a techno-economic analysis. *Appl Biochem Biotechnol*, **136**, 361–388.
- Hewald, S., Josephs, K., Bölker, M. and Bo, M. (2005) Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis* Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. *Applied and environmental microbiology*, **71**.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. a., Kämper, J. and Bölker, M. (2006) Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Applied and environmental microbiology*, **72**, 5469–77. ISSN 0099-2240.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, **11**, 1026–1030.

- Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1997) Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2 : two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8 . 5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon . Propionate Catab. *Journal of bacteriology*, **179**, 928.
- Jaklitsch, W., Kubicek, C. and Scrutton, M. (1991) Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol*, **37**, 823–827.
- Jakubowska J, M. D. (1974) Studies on the metabolic pathway for itatartaric acid formation by *Aspergillus terreus*. II. Use of (-)-citramalate, citraconate and itaconate by cell-free extracts. *Acta Microbiol Pol B.*, **6**, 51–61.
- Jakubowska J, Metodiewa D, Z. Z. (1974) Studies on the metabolic pathway for itatartaric acid formation by *Aspergillus terreus*. I. Metabolism of glucose and some C5 and C6-carboxylic acids. *Acta Microbiol Pol B.*, **6**, 43–50.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (2005) Drag&Drop cloning in yeast. *Gene*, **344**, 43–51. ISSN 0378-1119.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O. and Al., E. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*.
- Kanamasa, S., Dwiarti, L., Okabe, M. and Park, E. Y. (2008) Cloning and functional characterization of the cis-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Applied microbiology and biotechnology*, **80**, 223–9. ISSN 0175-7598.
- Kaplan, R., Mayor, J., Gremse, D. and Wood, O. (1995) High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transportprotein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 4108–4114.
- Keller, N. P., Turner, G. and Bennett, J. W. (2005) Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews. Microbiology*, **3**, 937–47. ISSN 1740-1526.
- Kennedy, J. (1999) Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis. *Science*, **284**, 1368–1372. ISSN 00368075.
- Khalidi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. and Fedorova, N. D. (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **47**, 736–41. ISSN 1096-0937.
- Kim, M., Koh, H., Obata, T., Fukami, H. and Shii, S. I. (1976) Isolation and Identification of trans - aconitic acid as the antifeedant in barnyard grass against the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Appl. Entomol. Zool.*, **11**, 53–57.
- Kinoshita, K. (1932) Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim.*

- Klement, T., Milker, S., Jäger, G., Grande, P. M., María, P. D. D. and Büchs, J. (2012) Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial Cell Factories*, **11**, 43. ISSN 1475-2859.
- Klinman, J. P. and Rose, I. A. (1971) Mechanism of the aconitate isomerase reaction. *Biochemistry*, **10**, 2259–66. ISSN 0006-2960.
- Lauble, H., Kennedy, M. C. and Beinert, H. (1994) Crystal Structures of Aconitase with Trans-Aconitate and Nitrocitrate bound. *J. Mol. Biol.*, **237**, 437–451.
- Law, C. J., Maloney, P. C. and Wang, D.-n. (2009) In and outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. *Annual review of microbiology*, **62**, 289–305.
- Lee, J. W., Kim, H. U., Choi, S., Yi, J. and Lee, S. Y. (2011) Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current opinion in biotechnology*, **22**, 758–67. ISSN 1879-0429.
- Lemieux, R., Thorn, J., Brice, C. and Haskins, R. (1951) Biochemistry of the ustilaginales. II. Isolation and partial characterization of ustilagic acid. *Can J Chem*, **29**, 409–414.
- Li, A., van Luijk, N., ter Beek, M., Caspers, M., Punt, P. and van der Werf, M. (2011) A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **48**, 602–11. ISSN 1096-0937.
- Lockwood, L. and Reeves, M. (1945) Some factors affecting the production of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Arch Biochem*, **6**, 455–469.
- Maasem-Panakova, M. (2013) *Itaconate production by Ustilago maydis: the influence of genes and cultivation conditions*. Dissertation, RWTH Aachen.
- Machowinski, A., Krämer, H.-J., Hort, W. and Mayser, P. (2006) Pityriacitrin—a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses*, **49**, 388–92. ISSN 0933-7407.
- MacLennan, D. H. and Beevers, H. (1964) Trans-Aconitate in plant tissue. *Phytochemistry*, **3**, 109–113.
- Mayser, P., Wille, G., Imkamp, A., Thoma, W., Arnold, N. and Monsees, T. (1998) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses*, **41**, 265–271.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. a., Weber, T., Takano, E. and Breitling, R. (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, **39**, W339–46. ISSN 1362-4962.
- Michelucci, A., Cordes, T., Ghelfi, J., Pailot, A., Reiling, N., Goldmann, O., Binz, T., Wegner, A., Tallam, A., Rausell, A., Buttini, M., Linster, C. L., Medina, E., Balling, R. and Hiller, K. (2013) Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing



- itaconic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 7820–5. ISSN 1091-6490.
- Mingot, J., Peñalva, M. and Fernández-Cañón, J. (1999) Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14545–50.
- Moore, R., Bigam, G., Chan, J., Hogg, A., Nakashima, T. and Vederas, J. (1985) Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevinolin by *Aspergillus terreus*: determination of the origin of carbon, hydrogen and oxygen atoms by carbon-13 NMR and mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3694–3701.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 263–273.
- Neilands, J. (1952) A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*). *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4846–4847.
- Nelson, G., Trauffer, D., Kelley, S. and Lockwood, L. (1952) Production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* in 20-liter fermentors. *Ind Eng Chem*, **44**, 1166–1168.
- Nesbitt, B., OKelly, J., Sargeant, K. and Sheridan, A. (1962) Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, **195**, 1062– 63.
- Nogales, J., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., Serra, B., Pingarrón, J. M., García, J. L. and Díaz, E. (2011) Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from *Pseudomonas putida*. *Molecular microbiology*, **79**, 359–74. ISSN 1365-2958.
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S. and Park, E. Y. (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **84**, 597–606.
- Ornston, L. N. and Stanier, R. Y. (1966a) The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *The Journal of biological chemistry*, **241**, 3776–86. ISSN 0021-9258.
- Ornston, L. N. and Stanier, R. Y. (1966b) The Protocatechuate pathway: The Conversion of Catechol and Protocatechuate to beta-Ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *The Journal of biological chemistry*.
- Pao, S. S., Paulsen, I. A. N. T. and Saier, M. H. (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1–34.
- Pereira, G., Tanaka, T. U., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (2001) Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *The EMBO journal*, **20**, 6359–70. ISSN 0261-4189.

- Pfeifer, V., Vojnovich, C. and Heger, E. (1952) Itaconic acid by fermentation with *Aspergillus terreus*. *Ind Eng Chem*, **44**, 2975–2980.
- Rebholz, K. L. and Northrop, D. B. (1994) Kinetics of Enzymes with Iso-Mechanisms: Dead-End Inhibition of Fumarase and Carbonic Anhydrase II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **312**, 227–233.
- Reed, R. and Holder, M. (1953) The antibacterial spectrum of ustilagic acid. *Can. J. Med Sci.*, **31**, 505–511.
- Rhagavendra Rao, M. and Altekhar, W. (1961) Aconitate Isomerase. *Biochemical and Biophysical research communications*, **4**, 101–105.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463–5467.
- Sasikaran, J., Ziemiński, M., Zadora, P. K., Fleig, A. and Berg, I. A. (2014) Bacterial itaconate degradation promotes pathogenicity. *Nature Chemical Biology*, **10**, 371–377.
- Self, A. and Hall, A. (1995) Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia Coli*. *Methods Enzymol*, **256**, 3–10.
- Sharp, P., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055–63.
- Shi, L., Adkins, J. N., Coleman, J. R., Schepmoes, A. a., Dohnkova, A., Mottaz, H. M., Norbeck, A. D., Purvine, S. O., Manes, N. P., Smallwood, H. S., Wang, H., Forbes, J., Gros, P., Uzzau, S., Rodland, K. D., Heffron, F., Smith, R. D. and Squier, T. C. (2006) Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 29131–40. ISSN 0021-9258.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19–27.
- Smith, D., Burnham, M., Edwards, J., Earl, A. and Turner, G. (1990) Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *penicillium chrysogenum*. *Biotechnology (NY)*, **8**, 39–41.
- Snetselaar, K., Bölker, M. and Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **20**, 299–312.
- Southern, E. (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Biotechnology*, **24**, 122–139.

- Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol*, **18**, 61–67.
- Stodola, F. H., Friedkin, M., Andrew, J. and Coghill, R. D. (1945) Accumulation of Itaconic , 2-Hydroxyparaconic , Itatartaric , and Malic Acids by Strains of the Genus *Ustilago*. *Journal of biological chemistry*, **161**, 739–742.
- Strelko, C. L., Lu, W., Dufort, F. J., Seyfried, T. N., Chiles, T. C., Rabinowitz, J. D. and Roberts, M. F. (2011) Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc.*, **133**, 16386–16389.
- Tabuchi, T. and Hara, S. (1974) Production of 2-methylisocitric acid from N-paraffins by mutants of *candida-lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1105–1106.
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A. and Bölker, M. (2007) A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, **66**, 525–33. ISSN 0950-382X.
- Teichmann, B., Liu, L., Schink, K. O. and Bölker, M. (2010) Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in *Ustilago maydis* by the C2H2 zinc finger transcription factor Rua1. *Applied and environmental microbiology*, **76**, 2633–40. ISSN 1098-5336.
- Thompson, J. F., Schaefer, S. C. and Madison, J. T. (1990) Determination of aconitate isomerase in plants. *Analytical biochemistry*, **184**, 39–47. ISSN 0003-2697.
- Tilburn, J. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, **14**, 779–790.
- Trail, F., Mahanti, N., Rarick, M., Mehig, R., Liang, S. H. and Zhou, R. (1995) Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway . Physical and Transcriptional Map of an Aflatoxin Gene Cluster in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and environmental microbiology*, **61**, 2665.
- van der Straat, L., Vernooij, M., Lammers, M., van den Berg, W., Schonewille, T., Cordewener, J., van der Meer, I., Koops, A. and de Graaff, L. H. (2014) Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. *Microbial cell factories*, **13**, 11. ISSN 1475-2859.
- Velarde, M., Macieira, S., Hilberg, M., Bröker, G., Tu, S.-M., Golding, B. T., Pierik, A. J., Buckel, W. and Messerschmidt, A. (2009) Crystal Structure and Putative Mechanism of 3-Methylitaconate- $\Delta$ -isomerase from *Eubacterium barkeri*. *Journal of Molecular Biology*, **391**, 609–620.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. and Van Dijken, J. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, **8**, 501–17.

- Vida, T. A. and Em, S. D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779–792.
- Voll, A. and Marquardt, W. (2012) Reaction Network Flux Analysis : Optimization-Based Evaluation of Reaction Pathways for Biorenewables Processing. *AIChE Journal*, **58**, 1788–1801.
- Walsh, C. T. (2008) The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Accounts of chemical research*, **41**, 4–10. ISSN 1520-4898.
- Walton, J. D. (2000) Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **30**, 167–71. ISSN 1087-1845.
- Wang, A. M., Doyle, M. V. and Mark, D. F. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 9717–21. ISSN 0027-8424.
- Watanabe, K., Katsuhara, M., Nakao, H. and Sato, M. (1997) Detection and molecular analysis of plant- and insect-associated bacteria harboring aconitate isomerase involved in biosynthesis of trans-aconitic acid as antifeedant in brown planthoppers. *Current microbiology*, **35**, 97–102. ISSN 0343-8651.
- Werpy, T. and Petersen, G. (2004) Top value added chemicals from biomass, Volume 1: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Technical report, Department of Energy Washington DC, United States.
- White, T., Arnheim, N. and Erlich, H. (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet*, **5**, 185–189.
- Williams, S. E., Woolridge, E. M., Ransom, S. C., Landro, J. A., Babbitt, P. C. and Kozarich, J. W. (1992) 3-Carboxy-cis,cis-muconate Lactonizing Enzyme from *Pseudomonas putida* Is Homologous to the Class II Fumarase Family: A New Reaction in the Evolution of a Mechanistic Motif. *Biochemistry*, **31**, 9768–9776.
- Willke, T. and Vorlop, K.-D. (2001) Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**, 289–295.
- Yang, J., Wang, Y., Woolridge, E. M., Arora, V., Petsko, G. a., Kozarich, J. W. and Ringe, D. (2004) Crystal structure of 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida*, a fumarase class II type cycloisomerase: enzyme evolution in parallel pathways. *Biochemistry*, **43**, 10424–34. ISSN 0006-2960.
- Yim, G., Wang, H. H. and Davies, J. (2007) Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **362**, 1195–200. ISSN 0962-8436.

- Yoshizawa, Y., Witter, D., Liu, Y. and Vederas, J. (1994) Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevinolin (Lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2693–2694.
- Zheng, Y., Kief, J., Auffarth, K., Farfsing, J. W., Mahlert, M., Nieto, F. and Basse, C. W. (2008) The *Ustilago maydis* Cys2His2-type zinc finger transcription factor Mzr1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Molecular microbiology*, **68**, 1450–70. ISSN 1365-2958.
- Zuther, K., Mayser, P., Hettwer, U., Wu, W., Spiteller, P., Kindler, B. L. J., Karlovsky, P., Basse, C. W. and Schirawski, J. (2008) The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, **68**, 152–72. ISSN 1365-2958.

# Abkürzungen

AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
Cbx	Carboxin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dYT	<i>double yeast tryptone</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteres
GTP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hyg	Hygromycin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Luria Broth</i>
LiT	Lithium-Acetat / Tris
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
m	mili
M	molar
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
$\mu$	micro
n	nano
N-terminus	Amino-Terminus
Nat	Nourseothricin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTP	Nukleotidtriphosphat

OD600	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H^+$ -Ionenkonzentration
PD	potato dextrose
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	Rot fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SC	Synthetisches Nährmedium für <i>S. cerevisiae</i> <i>synthetic complete</i>
SCS	Natriumcitrat-Sorbitol-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
STC	Sorbitol-Tris-Kalcium-Puffer
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TAE	Tris/Acetat/EDTA
UV	Ultraviolett
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein <i>Yellow fluorescent protein</i>
YEP	<i>yeast extract + peptone</i>
YEPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>
YPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>
YEPS	<i>yeast extract + peptone + sucrose</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
WT	Wildtyp

# Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Prof. Dr. Michael Bölker für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen und für all die Unterstützung, die ich dabei von ihm erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. Johann Heider danke ich, dass er sich bereit erklärte, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Regine Kahmann und Prof. Dr. Alfred Batschauer für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinem TAC bestehend aus Prof. Dr. Michael Bölker, Prof. Dr. Johann Heider, Prof. Dr. Regine Kahmann und Dr. Christof Taxis für die anregenden Diskussionen und guten Ideen zu meinem Projekt, die bei diesen Treffen entstanden sind.

Dem SFB987 "Microbial Diversity in Environmental Signal Response", sowie der IMPRS Mol-Mic danke ich für die finanzielle Unterstützung und die gute Lehre, die ich hier erfahren durfte. Ein ganz besonderer Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Bölker, bestehend aus: Alina, Birgit, Björn, Britta, Domenica, Dr. Escher, Elaine, Esme, Johannes, Julia, Marisa, Michi, Silke, Tobi und Thorsti für die lustige Zeit, die Rettung aus kleinen und großen Nöten, die Instandhaltung des Schoki-Schranks, sowie das super Arbeitsklima. Ihr habt meinen Arbeitsalltag mehr als erleichtert! Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen IA-Mädels Alex und Linda: Danke für die super Zusammenarbeit an diesem Projekt und die schöne gemeinsame Zeit!

Ein großes Dankeschön geht auch an Marco M. aus der AG Heider, der mich in die Geheimnisse der HPLC eingeführt und aus so manchen Katastrophen diesbezüglich gerettet hat.

Lieber F, auch dir möchte ich an dieser Stelle danken - dafür, dass du die letzten Jahre immer ein offenes Ohr für mich hattest, du auch in schwierigen Zeiten nicht von meiner Seite weichst, dass du mehr an meine Fähigkeiten glaubst als ich und stetig daran arbeitest mich noch ein bisschen besser zu machen und noch für etwa 1000 weitere Dinge, für die der Platz hier leider nicht ausreicht. Ich bin froh dir begegnet zu sein, du hast mein Leben bereichert!

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die immer für mich da waren, an mich geglaubt haben und mich in allem unterstützt haben, egal wie verrückt und Aussichtslos es zunächst auch erschien.



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sandra Kathrin Przybilla, geboren am 25.11.1986 in Gummersbach, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel „**Genetische und biochemische Charakterisierung der Itaconsäure-Biosynthese in *Ustilago maydis***“ selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg/Lahn

---

Sandra Przybilla